

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie,
Hepatologie und Endokrinologie, Charité Campus Mitte
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Regulation des epithelialen Natriumkanals der Niere (ENaC) durch Androgene

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Tina Ulrike Kienitz
aus Borna

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. M. Quinkler
 2. Prof. Dr. J. Köhrle
 3. Prof. Dr. F. Beuschlein

Datum der Promotion: 18.09.2009

Wege entstehen dadurch,
dass man sie geht.

Franz Kafka

I Inhaltsverzeichnis

I	INHALTSVERZEICHNIS.....	4
II	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	7
III	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	10
1	EINLEITUNG.....	12
1.1	GESCHLECHTSSPEZIFISCHE BLUTDRUCKREGULATION	12
1.1.1	Studien in menschlichen Populationen.....	12
1.1.2	Tiermodelle	14
1.2	BLUTDRUCKREGULATION DURCH GESCHLECHTSHORMONE	14
1.2.1	Einfluss von Geschlechtshormonen auf das kardiovaskuläre System	14
1.2.1.1	<i>Gefäßtonus und Atherogenese</i>	14
1.2.1.2	<i>Kardiale Mechanismen</i>	18
1.2.2	Einfluss von Geschlechtshormonen auf Nierenfunktion und –metabolismus	18
1.2.2.1	<i>Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)</i>	19
1.2.2.2	<i>Direkte Androgen-Effekte auf das renale Tubulussystem</i>	21
1.2.3	Zentrale Blutdruckregulation	21
1.3	EPITHELIALER NATRIUMKANAL (ENaC).....	22
1.3.1	Struktur des ENaC	22
1.3.2	Funktion des ENaC und Regulatoren.....	24
1.4	ANDROGEN-REZEPTOR (AR)	27
1.4.1	Struktur und Funktion.....	27
1.4.2	Autoregulation des AR	27
1.5	ZIELE DER ARBEIT	28
2	MATERIALIEN UND METHODEN.....	30
2.1	MATERIALIEN	30
2.1.1	Zelllinien und Medien	30
2.1.2	Längenstandards, Primer, Enzyme, Antikörper.....	30
2.1.3	Kommerzielle Reaktionssysteme	33
2.1.4	Chemikalien und Biochemikalien	33
2.1.5	Standardpuffer und –lösungen	35
2.1.6	Laborgeräte	36
2.1.7	Molekularbiologische Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	37
2.1.8	Software.....	38

2.2	METHODEN.....	39
2.2.1	Expressionsstudien in vitro	39
2.2.1.1	<i>Kultivierung von eukaryontischen Zellen</i>	39
2.2.1.2	<i>Stimulation von Zellen</i>	39
2.2.2	Expressionsstudien in vivo	40
2.2.3	Isolierung von RNA	41
2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.2.4.1	<i>Semiquantitative PCR</i>	43
2.2.4.2	<i>Gelelektrophorese</i>	44
2.2.4.3	<i>Realtime-PCR</i>	44
2.2.5	Isolierung von Protein	46
2.2.6	Western Immunoblot.....	47
2.2.6.1	<i>Western Blot</i>	47
2.2.6.2	<i>Immunoblot</i>	48
2.2.7	Statistische Auswertung	50
2.2.8	Transkriptionsfaktorenanalyse der Promoterregion	51
3	ERGEBNISSE	52
3.1	CHARAKTERISIERUNG DER TIERE DER IN VIVO EXPRESSIONSSTUDIEN	52
3.2	RENALE ENAC EXPRESSION.....	53
3.3	RENALE AR EXPRESSION	58
3.4	IN VITRO STUDIEN.....	59
3.4.1	Expressions- und Stimulationsstudien in M1-Zellen	59
3.4.2	Expressions- und Stimulationsstudien in RCCD2-Zellen	60
3.4.3	Expressions- und Stimulationsstudien in VSMC-Zellen	63
3.5	TRANSKRIPTIONSFAKTOREANALYSE DER PROMOTER-REGIONEN.....	64
4	DISKUSSION	65
4.1	ANDROGEN-WIRKUNG IM RATTENMODELL IN VIVO	65
4.2	GESCHLECHTSSPEZIFISCHE UNTERSCHIEDE IN DER GRUNDEXPRESSION VON ENAC UND AR.....	67
4.3	GESCHLECHTSSPEZIFISCHE REGULATION VON ENAC.....	67
4.3.1	Mögliche molekulare Funktionsmechanismen Androgen-abhängiger Wirkungen: Hormon-responsive Elemente.....	68
4.3.2	Einfluss von Estrogenen auf die Expression von ENaC	71
4.3.3	Funktionalität des ENaC	72
4.4	AUTOREGULATION DES AR.....	72
4.5	REGULATION VON ENAC IN STIMULATIONSEXPERIMENTEN IN VITRO	74

Inhaltsverzeichnis

4.5.1	Ergebnisse aus einer kortikalen Sammelrohr-Zelllinie der Maus (M1)	74
4.5.2	Ergebnisse aus einer kortikalen Sammelrohr-Zelllinie der Ratte (RCCD2)	74
4.5.3	Ergebnisse aus primären Gefäßmuskelzellen der Ratte (VSMC)	75
4.6	LIMITATIONEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT.....	76
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	79
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	82
7	DANKSAGUNG	94
8	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	95
9	LEBENS LAUF	96
10	PUBLIKATIONEN	97

II Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

11beta-HSD2	11beta-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2
17beta-E2	17beta-Estradiol
20-HETE	20-Hydroxyeicosatetraenoat
5'-UTR	5'-untranslatierte Region (5'-untranslated region)
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin converting enzyme
AMV	Avian myeloblastosis virus
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AP-1	Activating protein 1 (aktivierendes Protein 1)
AP-2-alpha	Activating protein 2 alpha (aktivierendes Protein 2 alpha)
AP-4	Activating protein 4 (aktivierendes Protein 4)
APS	Ammoniumpersulfat
AQP-2	Aquaporin-2
AR	Androgen-Rezeptor
ARE	Androgen-responsives Element
ASDN	Aldosteron-sensibles distales Nephron
ASIC	Acid-sensing sodium channel
BD	Blutdruck
BSA	Bovine serum albumin (Albumin aus Rinderserum)
bzw.	beziehungsweise
C/EBP alpha	CCAAT/Enhancer-binding Protein alpha (CCAAT/Enhancer-bindendes Protein alpha)
CAP-1	Channel-activating protease-1
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNA)
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Ct	Threshold cycle
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat-H ₂ O
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	5alpha-Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E2	Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

Abkürzungsverzeichnis

ENaC	Epithelialer Natriumkanal (Epithelial Sodium Channel)
EPO	Erythropoetin
ER	Estrogen-Rezeptor
ERE	Estrogen-responsives Element
et al.	et alii (lateinisch: und andere)
FCS	Fetal calf serum (fetales Rinderserum)
GATA1	GATA binding protein 1 (Globin transcription factor 1) (GATA Bindungsprotein 1)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GRE	Glukokortikoid-responsives Element
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
HDL	High density lipoprotein
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low density lipoprotein
männl.	männlich
MR	Mineralokortikoid-Rezeptor
mRNA	Messenger RNA
n.b.	nicht bestimmt
neg	negativ
NF1-alpha	Nuclear factor 1-alpha (Nukleärer Faktor 1-alpha)
NIH	National Institutes of Health
NTP	Nukleosidtriphosphat
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PHA-1	Pseudohypoaldosteronismus Typ 1
PRA	Plasma-Renin-Aktivität
qPCR	quantitative PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RCCD2	Rat cortical collecting duct 2 (Zelllinie)
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium Channel
rRNA	Ribosomal RNA (ribosomale RNA)
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SGK1	Serum-und-Glukokortikoid-regulierte Kinase 1
SHR	Spontan Hypertensive Ratten (Spontaneously Hypertensive Rats)
SP1	Stimulatory protein 1 (stimulierendes Protein 1)

Abkürzungsverzeichnis

T	Testosteron
Tab.	Tabelle
TUD100	Testosteron-Undecanoat 100 mg/kg KG
TUD500	Testosteron-Undecanoat 500 mg/kg KG
vCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
vs.	versus
VSMC	Vascular smooth muscle cells (glatte Gefäßmuskelzellen)

Einheiten

°C	Grad Celsius
μ	mikro-
A	Ampere
bp	Basenpaar(e)
c	zenti-
d	dezi-
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
k	kilo-
kb	Kilobasen
l	Liter
m	Meter
M	Molar (mol/l)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mol	SI-Basiseinheit der Stoffmenge
n	nano-
p	piko-
pH	Konzentration der H ⁺ -Ionen (potentia hydrogenii)
p	piko-
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
U	Unit (Einheit)
V	Volt

III Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Einfluss von Alter und Geschlecht auf den Blutdruck (BD)
- Abbildung 2: Prävalenz der arteriellen Hypertonie nach Alter und ethnischer Abstammung bei Männern und Frauen
- Abbildung 3: Einfluss von Androgenen auf die Gefäße
- Abbildung 4: Einfluss von Androgenen auf Herz und Niere
- Abbildung 5: Wirkung von Aldosteron auf den distalen Tubulus
- Abbildung 6: Detektion spezifischer Banden von renalem Protein von alpha-ENaC und AR im Western Blot
- Abbildung 7: Semiquantitative PCR für ENaC-Untereinheiten und AR in orchiektomierten männlichen Ratten
- Abbildung 8: Vielfache Änderung der alpha-ENaC mRNA Expression bei gonadektomierten männlichen und weiblichen Ratten
- Abbildung 9: Repräsentative Western Blots von alpha-ENaC Protein in männlichen und weiblichen Ratten
- Abbildung 10: Vielfache Änderung der renalen beta-ENaC mRNA Expression in orchiektomierten männlichen und ovariectomierten weiblichen Ratten
- Abbildung 11: Repräsentative Western Blots von beta-ENaC Protein in männlichen und weiblichen Ratten
- Abbildung 12: Vielfache Änderung der renalen gamma-ENaC mRNA Expression in orchiektomierten männlichen und ovariectomierten weiblichen Ratten
- Abbildung 13: Vielfache Änderung der renalen AR mRNA Expression in orchiektomierten männlichen und ovariectomierten weiblichen Ratten
- Abbildung 14: Repräsentative Western Blots von AR Protein in männlichen Ratten
- Abbildung 15: Vielfache Änderung der renalen alpha-ENaC mRNA Expression in M1-Zellen nach Stimulation mit Testosteron 10^{-7} M über mehrere Stunden
- Abbildung 16: Vielfache Änderung der renalen mRNA Expression von alpha-ENaC, beta-ENaC und gamma-ENaC in M1-Zellen nach Stimulation mit Aldosteron 10^{-11} M bis 10^{-8} M über 48 h
- Abbildung 17: Vielfache Änderung der renalen alpha-ENaC mRNA Expression in RCCD2-Zellen nach Stimulation mit Aldosteron und Spironolacton über 48 h

- Abbildung 18: Vielfache Änderung der renalen alpha-ENaC mRNA Expression in RCCD2-Zellen nach Stimulation mit Testosteron 50 nM, DHT 50 nM und Flutamid 50 nM über 24 h
- Abbildung 19: Vielfache Änderung der renalen alpha-ENaC mRNA Expression in VSMC-Zellen nach Stimulation mit Testosteron 50 nM, DHT 50 nM und Flutamid 50 nM über 24 h
- Abbildung 20: Repräsentative schematische Darstellung der 5'-UTR des alpha-ENaC-Gens der Ratte mit potentiellen Bindungsmotiven für ausgewählte Transkriptionsfaktoren
- Abbildung 21: Metabolisierung von Testosteron
- Abbildung 22: Repräsentative schematische Darstellung der 5'-UTR des alpha-ENaC-Gens des Menschen mit potentiellen Bindungsmotiven für ausgewählte Transkriptionsfaktoren
- Abbildung 23: Wirkung von Androgenen auf den distalen Tubulus

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Zellmedien
- Tabelle 2: Primer für die semiquantitative PCR
- Tabelle 3: Enzyme
- Tabelle 4: Kommerzielle Reaktionssysteme
- Tabelle 5: Chemikalien und Biochemikalien
- Tabelle 6: Standardpuffer und -lösungen
- Tabelle 7: Laborgeräte
- Tabelle 8: Molekularbiologische Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien
- Tabelle 9: Software
- Tabelle 10: Bestimmung von Hormonspiegeln *in vivo* und relativem Nierengewicht in weiblichen und männlichen Wistar-Ratten

1 Einleitung

1.1 Geschlechtsspezifische Blutdruckregulation

1.1.1 Studien in menschlichen Populationen

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass Geschlechtshormone eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulation bei Männern und Frauen spielen. Während Jungen und Mädchen noch den gleichen arteriellen Blutdruck besitzen, zeigt sich mit Beginn der Pubertät ein sexueller Dimorphismus, der im Laufe des Erwachsenenalters zunächst bestehen bleibt [1-4] (Abb. 1). Männer weisen einen systolischen arteriellen Blutdruck von etwa 6-7 mmHg über dem altersgleicher Frauen auf [6]. Der diastolische Blutdruck unterscheidet sich um etwa 3-5 mmHg und liegt bei Männern ebenfalls über dem der Frauen [6]. Diese Differenz ist vollkommen unabhängig von der ethnischen Abstammung der untersuchten Individuen. Ab etwa dem 60. Lebensjahr steigt der systolische Blutdruck bei Frauen stärker an als der bei Männern. Diese Übergangsphase dauert etwa 5-20 Jahre, bis die arterielle Hypertonie schließlich in beiden Geschlechtern gleichermaßen prävalent ist (Abb. 2) [7]. Obwohl der Abfall der Estrogen-Spiegel bei meno- und postmenopausalen Frauen zum Teil für diesen Prozess verantwortlich sein könnte, haben Tierstudien gezeigt, dass eine Verschiebung des Androgen/Estrogen-Quotienten nach der

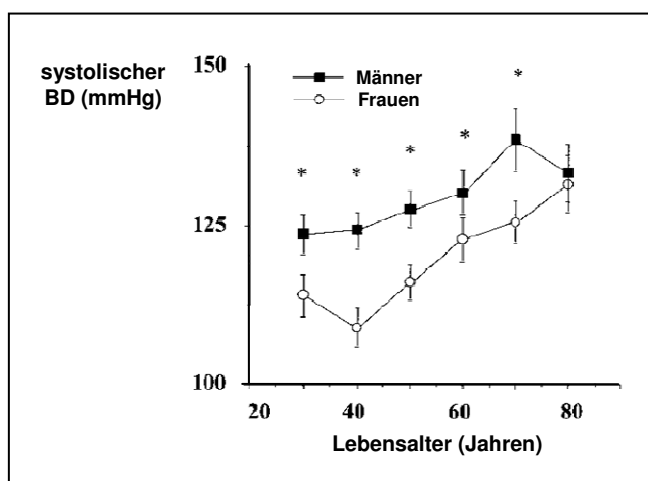


Abbildung 1: Einfluss von Alter und Geschlecht auf den Blutdruck (BD). Systolischer BD einer dänischen Kohorte (n=352) für 24 h gemessen und als Mittelwert \pm SD dargestellt. *: $P < 0,05$ verglichen mit Frauen ähnlichen Alters. Daten von Wiinberg et al. [1], modifiziert nach Reckelhoff et al. [5].

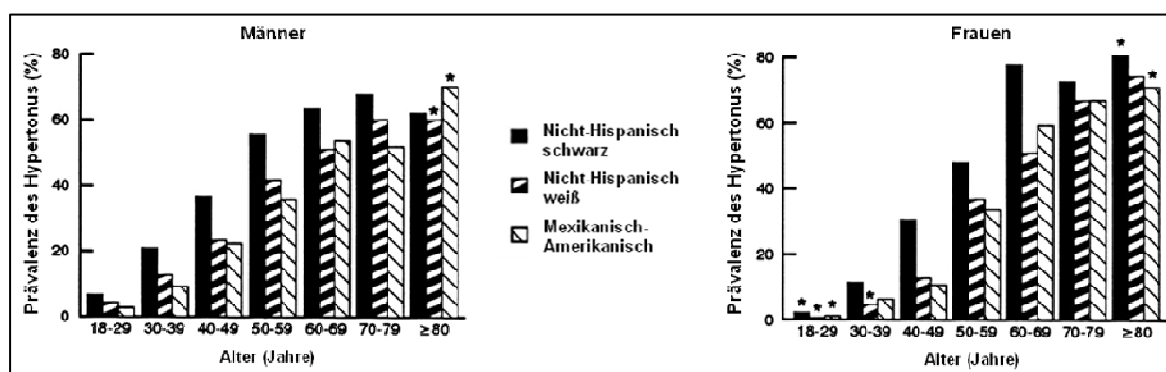


Abbildung 2: Prävalenz der arteriellen Hypertonie nach Alter und ethnischer Abstammung bei Männern und Frauen. US-amerikanische Bevölkerung ab dem 18. Lebensjahr. * Berechnung erfüllt nicht Kriterien des NHANES III Studiendesigns (ungenügende Gruppenstärke) oder die relative SD ist >30%. Abbildung modifiziert nach Burt et al. [7].

Menopause und das resultierende „Ungleichgewicht“ die in diesem Rahmen stattfindenden Veränderungen von kardiovaskulären und renalen Prozessen bedingen könnten [5]. Des Weiteren besteht der Verdacht, dass postmenopausal auch die Sensibilität gegenüber Androgenen bei Frauen steigen könnte. Bezüglich der postmenopausalen Hormonersatztherapie wurden keine signifikanten Blutdrucksenkungen in den untersuchten Studienpopulationen beobachtet [8-10].

Eine Reihe von klinischen Studien weisen darauf hin, dass Androgene Einfluss auf kardiovaskuläre und renale Mechanismen im menschlichen Organismus haben. Männer haben ein höheres Risiko als prämenopausale Frauen, eine koronare Herzkrankheit (KHK) oder eine arterielle Hypertonie zu entwickeln [11-13]. Männer mit erniedrigten Testosteron- und erhöhten Estrogen-Spiegeln haben eine geringere Inzidenz für die KHK [14]. Eine Orchiektomie reduziert die Mortalität infolge kardialer Erkrankungen bei Männern [15]. Des Weiteren zeigt sich eine Assoziation zwischen dem Polyzystischen Ovariellen Syndrom (PCOS), welches mit chronischer Anovulation und einem erhöhten Testosteron-Spiegel bei Frauen einhergeht, und der arteriellen Hypertonie [16] sowie einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkt und KHK [15, 17-19]. Es ist bekannt, dass die Einnahme anaboler Steroide (synthetische Derivate von Testosteron) mit dem Auftreten von arterieller Hypertonie, ventrikulärem Remodelling, myokardialer Ischämie sowie plötzlichem Herztod vergesellschaftet ist [20]. Studien, die die Wirkung anaboler Steroide untersuchen, müssen allerdings mit Vorsicht interpretiert werden, da die Einnahme dieser Substanzen oft verheimlicht wird und bislang nur wenige kontrollierte Studien durchgeführt worden sind.

1.1.2 Tiermodelle

Geschlechtsspezifische Blutdruckunterschiede wurden ebenso in einer Reihe von Tiermodellen beobachtet. Männliche „spontaneously hypertensive rats“ (SHR) [21-23], „Dahl salt-sensitive rats“ [24, 25], „deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats“ [26] sowie „New Zealand genetically hypertensive rats“ [27] besitzen einen höheren Blutdruck als ihre weiblichen Artgenossen. Kastration der Männchen in diesen Tiermodellen hat ein Sinken des Blutdrucks zur Folge [21-23, 28, 29]. Eine Ovariectomie in weiblichen SHR scheint den Blutdruck hingegen nicht zu beeinflussen [22]. Die Behandlung der kastrierten männlichen bzw. ovariectomierten weiblichen SHR mit Testosteron führt wiederum zum Ansteigen des Blutdrucks [21, 22]. Dieser Effekt kann durch die Gabe des Androgen-Rezeptor (AR) Antagonists Flutamid erneut aufgehoben werden [30]. Die Metabolisierung von Testosteron zu dem wirkungsstärkeren Androgen 5alpha-Dihydrotestosteron (DHT) scheint in diesen Studien hingegen keinen relevanten Einfluss auf die Entstehung des Bluthochdrucks zu haben. Finasterid, welches die Reduktion von Testosteron zu DHT verhindert, kann die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie in SHR nicht verhindern [30].

1.2 Blutdruckregulation durch Geschlechtshormone

1.2.1 Einfluss von Geschlechtshormonen auf das kardiovaskuläre System

1.2.1.1 Gefäßtonus und Atherogenese

Testosteron ist in der Lage, sowohl vasodilatative als auch vasokonstriktive Mechanismen zu aktivieren. Dies scheint abhängig von der Vorbehandlung oder dem initialen Zustand der untersuchten Gefäßzellen zu sein. Dabei bestimmt wahrscheinlich die Summe aus vasodilatativen und vasokonstriktiven Prozessen den durch Testosteron beeinflussten Gefäßmuskeltonus. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die Wirkung von Androgenen auf die Gefäße.

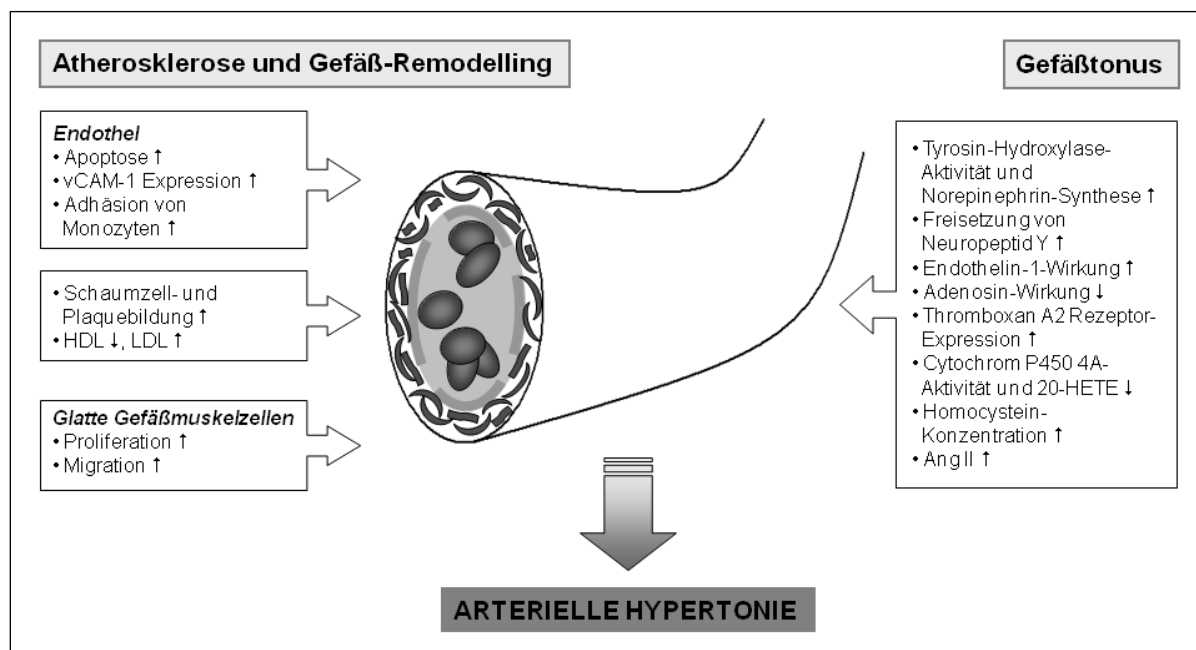


Abbildung 3: Einfluss von Androgenen auf die Gefäße. Ins Deutsche übersetzt aus eigener Publikation [31].

Testosteron relaxiert Koronararterien in Hasen *in vitro* [32, 33] und *in vivo*. Die kurzzeitige intrakoronare Infusion von Testosteron bei Männern mit einer KHK bewirkt eine Vasodilatation koronarer Arterien und erhöht den koronaren Blutfluss innerhalb von Minuten [34]. Dieser Prozess kann nicht durch Gabe von AR-Inhibitoren gehemmt werden. Inhibitoren von Transkriptions- (Actinomycin D) sowie Translationsprozessen (Cycloheximid) sind nicht in der Lage, die durch physiologische Konzentrationen von Testosteron induzierte Vasodilatation in Koronararterien von Schweinen zu verhindern [35]. Die akuten Wirkungen von Testosteron scheinen somit AR-unabhängig und nicht-genomisch zu sein. Die durch Testosteron induzierte Vasodilatation kann nicht durch Aromatase-Inhibitoren, die eine Metabolisierung von Testosteron zu Estradiol (E2) verhindern, gehemmt werden, wie in Ratten [36] und Hasen [33] gezeigt werden konnte. Die Gabe von DHT, welches nicht aromatisiert werden kann, bewirkte eine ähnliche Vasodilatation in Koronararterien von Schweinen wie die Gabe von Testosteron [37]. Dies weist darauf hin, dass E2 nicht zur durch Testosteron vermittelten Vasodilatation beiträgt.

In klinischen Fall-Kontroll-Studien bzw. randomisierten, doppel-blinden Crossover-Studien konnte ebenfalls ein positiver Effekt von Testosteron auf den Gefäßtonus beobachtet werden. Testosteron vermindert ST-Strecken-Senkungen bei

Patienten mit Angina pectoris nach körperlicher Beanspruchung [15, 34, 38, 39] und verringert myokardiale Ischämien bei Patienten mit KHK [39, 40].

Testosteron stimuliert jedoch auch verschiedene vasokonstriktive Prozesse auf direkte und indirekte Weise. Durch Stimulierung der Tyrosin-Hydroxylase in SHR fördert Testosteron die Synthese von Norepinephrin und mag so zur Entwicklung der arteriellen Hypertonie in diesen Tieren beitragen [41, 42]. Testosteron fördert außerdem die Freisetzung des Vasokonstriktors Neuropeptid Y in Ratten [43] und vermittelt die Wirkung von Endothelin-1 in Koronararterien von Schweinen [35]. Des Weiteren hemmt Testosteron die Wirkung einiger Vasodilatoren, so zum Beispiel Adenosin, wie in isolierten Rattenherzen gezeigt werden konnte [44]. Sowohl Testosteron [45, 46] als auch sein Vorläufer Androstenedion [47] erhöhen AR-abhängig die Expression des Thromboxan A₂-Rezeptors. Dies mag die höhere Empfindlichkeit der Aorta intakter männlicher Ratten gegenüber Thromboxan A₂, verglichen mit der Aorta kastrierter Männchen, erklären [46]. In Ratten bewirkt die Hemmung des Cytochroms P450 4A, welches in Gefäßzellen exprimiert wird und durch Androgene stimuliert werden kann, eine verminderte Produktion von 20-Hydroxyeicosatetraenoat (20-HETE) [48]. 20-HETE sensibilisiert Gefäßmuskelzellen für Vasokonstriktoren und fördert myogene, mitogene und angiogene Prozesse. Dies weist darauf hin, dass 20-HETE eine Rolle im Rahmen der durch Androgene vermittelten Hypertonie spielen könnte. Des Weiteren steigert Testosteron die Homocystein-Spiegel in transsexuellen Patienten [49] und fördert die Synthese von Angiotensin II (Ang II) in SHR [23], wodurch vasokonstriktive und atherosklerotische Mechanismen induziert werden können.

Studien, die den Einfluss von Testosteron auf Atherogenese und Gefäßproliferation untersucht haben, kommen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Testosteron fördert mitogene Effekte in Gefäßmuskelzellen von Ratten [50]. Es verstärkt die Expression von vCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und vermittelt so die Adhäsion von Monozyten an menschlichem Gefäßendothel [51]. Außerdem induziert Testosteron die Plaquebildung in den Gefäßen von Küken [52]. Testosteron vermindert die Konzentration von High Density Lipoprotein (HDL) und erhöht Low Density Lipoprotein (LDL)-Spiegel, wie in weiblichen Transsexuellen gezeigt werden konnte. Außerdem stimuliert Testosteron die Entwicklung von Atherosklerose und arteriellem Gefäß-Remodelling in weiblichen Affen [53].

Dennoch gibt es auch Studien, die auf eine anti-atherosklerotische Wirkung von Testosteron hinweisen. In Hasen verhindert Testosteron die Plaquebildung in Gefäßen nach Gefäßschädigung [32]. In Hasen, die cholesterolreich ernährt werden, schützt Testosteron vor Atherosklerose, unabhängig vom Lipidprofil der Tiere [54]. Allerdings verhindert Testosteron nicht die Proliferation von Gefäßmuskelzellen in Hasen *in vivo* [55] oder die Migration von Gefäßmuskelzellen in Ratten *in vitro* [56]. Letztendlich ist nicht klar, ob der anti-atherosklerotische Effekt wirklich Androgen-abhängig ist oder auf einer Umwandlung von Testosteron in E2 und E2-Metabolite beruht. Hemmung von atherosklerotischen Prozessen durch Gabe von Dehydroepiandrosteron (DHEA), welches ein Vorläufer von Androstenedion ist, kann durch den Aromatase-Inhibitor Fadrozol in Hasen wieder aufgehoben werden [57]. Der unmittelbare Vermittler anti-atherosklerotischer Wirkungen wurde bislang noch nicht identifiziert.

Man geht hingegen davon aus, dass Estrogene einen im Wesentlichen protektiven Einfluss auf das kardiovaskuläre System besitzen und vor der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie schützen. Unter anderem bewirkt E2 eine kurz- und langfristige Vasodilatation im Endothel von Mensch und Schaf [58, 59]. E2 hemmt vaskuläres Remodelling, indem es vor vaskulären Entzündungsprozessen, Neointima-Bildung und Rekrutierung von Makrophagen schützt [60, 61]. Des Weiteren verhindert E2 eine durch Mitogene vermittelte Proliferation kardialer Fibroblasten [62] und glatter Gefäßmuskelzellen [60]. Studien, die nach einer Korrelation zwischen Estrogenen und arterieller Hypertonie suchten, kamen jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen. In einer Reihe klinischer Studien konnte beobachtet werden, dass unterschiedliche Arten estrogenhaltiger Substanzen ganz spezifische Wirkungen zu haben scheinen [63]: Während kontrazeptive estrogenhaltige Medikamente den Blutdruck eher erhöhen, scheinen konjugierte Estrogene, welche von Pferden stammen, den Blutdruck nicht zu beeinflussen. E2 hingegen hat einen den Blutdruck senkenden Effekt. In hypertensiven Tiermodellen hat die Gabe von E2 einen Abfall des Blutdrucks zur Folge [24, 64-66]. Andererseits kann die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie in SHR nicht durch eine Ovariectomie der Weibchen verhindert werden [23]. Dies lässt vermuten, dass die blutdrucksenkende Wirkung von E2 kein physiologischer Prozess ist, sondern auf die hohen verabreichten Konzentrationen von E2 zurückzuführen sein könnte.

1.2.1.2 Kardiale Mechanismen

Sowohl Testosteron als auch DHT verursachen eine Hypertrophie des Herzens [67]. In Ratten, deren sinoaortale nervöse Kopplung unterbrochen wurde, induzierte Testosteron eine kardiale Hypertrophie, während E2 diese hemmte [68]. Androgene stimulieren das Wachstum kardialer Myozyten *in vitro*, was darauf hinweist, dass es sich um einen direkten Effekt handelt [67]. Im Gegensatz zu Testosteron bewirkt DHT in diesen Zellen einen Anstieg von atrialem natriuretischem Peptid (ANP). Abbildung 4 fasst die Einflüsse von Androgenen auf das Herz zusammen.

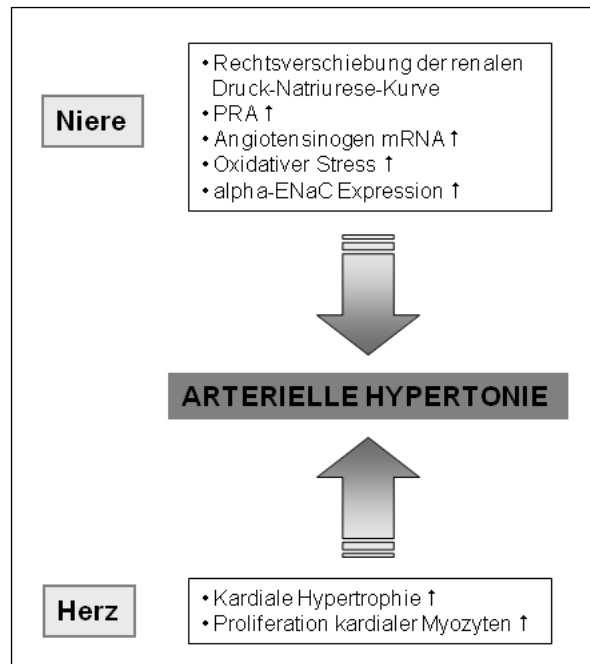


Abbildung 4: Einfluss von Androgenen auf Herz und Niere. Ins Deutsche übersetzt aus eigener Publikation [31].

1.2.2 Einfluss von Geschlechtshormonen auf Nierenfunktion und -metabolismus

Da Testosteron ein Risikofaktor für die Entwicklung von Atherosklerose zu sein scheint, wird verständlich, dass Androgene über die Schädigung von Glomerulumentothel auch Einfluss auf die Nierenfunktion besitzen. Männer haben ein höheres Risiko für Nierenschäden im Laufe ihres Lebens als Frauen [69]. Die Inzidenz der terminalen Niereninsuffizienz auf Boden einer Glomerulonephritis oder hypertensiven Glomerulosklerose liegt bei Männern ebenfalls höher als bei Frauen. Männer besitzen eine geringere glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und entwickeln glomeruläre Schäden, Glomerulosklerose und Proteinurie in einem früheren Lebensalter verglichen mit dem weiblichen Geschlecht [5, 70, 71]. Die Kastration von Ratten in einem frühen Lebensstadium verhindert Nierenschäden und Bluthochdruck. Auf der anderen Seite scheint E2 auch auf die Nierenfunktion einen eher protektiven

Effekt zu haben, indem es beispielsweise die Entwicklung einer Glomerulosklerose oder die Schädigung von Nierentubuli im Rattenmodell verhindert [72].

Die Transplantation prä-hypertensiver Nieren von SHR in Wistar-Kyoto-Ratten hat die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie zur Folge [73]. Auf der anderen Seite führt die Transplantation von Nieren normotensiver Spender zu einer Verbesserung des Blutdrucks bei Patienten, die aufgrund von Nephrosklerose und Nierenversagen eine essentiellen Hypertonie entwickelt hatten [74]. Die Transplantation von Nieren männlicher SHR in weibliche SHR führt zu keinem signifikanten Anstieg des Blutdrucks, und die Transplantation weiblicher Nieren in männliche SHR mildert nicht den Hypertonus in den männlichen Empfängern [75]. Dies lässt vermuten, dass der Bluthochdruck in SHR nicht auf dem Boden eines intrinsischen Geschehens in der Niere entsteht, sondern dass extrinsische Faktoren die Nierenfunktion beeinflussen.

Die Ausschaltung des Gens für CYP4A14 (Arachidonsäure ω -1 Hydroxylase) in Mäusen lässt den renalen Gefäßwiderstand ansteigen und führt bei Männchen zu höheren Blutdruckwerten als bei Weibchen [76]. Eine Kastration in diesen Tieren führt zur Senkung des Blutdrucks, während die Gabe von Testosteron diesen Effekt wiederum aufhebt.

1.2.2.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Interessanterweise ist die renale Druck-Natriuresis-Kurve bei Männern im Vergleich zu Frauen nach rechts verschoben [5, 73, 77]. Dies bedeutet, dass bei vergleichbarem Nierenperfusionssdruck männliche SHR sowie ovariectomierte weibliche SHR, die mit Testosteron behandelt wurden, signifikant weniger Natrium und Wasser sezernieren als weibliche, ovariectomierte weibliche oder kastrierte männliche SHR [22, 70].

Männer haben eine höhere Plasma-Renin-Aktivität (PRA) als Frauen, unabhängig von Alter oder ethnischer Abstammung [5, 22, 70, 78]. Auch die PRA in postmenopausalen Frauen liegt höher als die von prämenopausalen Frauen [79]. Die PRA sinkt nach Kastration männlicher SHR und steigt nach Gabe von Testosteron an ovariectomierte Weibchen. Dabei korreliert die PRA proportional mit der verabreichten Testosteron-Dosis [5]. In transgenen hypertensiven männlichen [80] und weiblichen [81] TGR(mREN2)27-Ratten, die ein überaktives RAAS aufweisen,

sinken nach Behandlung mit Flutamid Renin-Synthese und PRA und eine arterielle Hypertonie sowie maligne End-Organ-Schäden können verhindert werden.

In den Nieren männlicher Ratten zeigt sich eine stärkere Expression von Angiotensinogen mRNA im Vergleich zu Weibchen [82, 83]. Dieser Prozess scheint ebenfalls durch Androgene reguliert zu werden, stimuliert das RAAS und hat eine erhöhte Retention von Natrium und Wasser bei den Männchen zur Folge. Die Gabe von Enalapril, einem Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE)-Inhibitor, hatte eine Senkung des Blutdrucks um 60% bei männlichen und bei ovariectomierten weiblichen SHR, die mit Testosteron substituiert wurden, zur Folge, während bei intakten oder ovariectomierten Weibchen bzw. kastrierten Männchen der Blutdruck lediglich um 40% gesenkt werden konnte [23]. Diese erhöhte Sensibilität gegenüber Enalapril bei männlichen bzw. ovariectomierten weiblichen SHR unter Testosteron-Behandlung unterstützt die Vermutung, dass Androgene zum Teil über eine Stimulierung des RAAS zur Entwicklung einer Hypertonie beitragen. Man vermutet, dass ein Anstieg von Angiotensin II (Ang II) oxidativen Stress hervorruft, u.a. über die Stimulierung der Superoxid-Synthese, Abbau von NO, Anstieg von Peroxidnitrit und verstärkter Freisetzung von vasokonstriktorisches F₂-Isoprostanen. Dies wiederum würde die Empfindlichkeit renaler Gefäße gegenüber Vasodilatoren herabsetzen und gegenüber Vasokonstriktoren wie Ang II steigern und könnte die Endothelin-Produktion stimulieren [5]. F₂-Isoprostane scheinen außerdem Thromboxan-Rezeptoren zu aktivieren, deren Expression wiederum von Androgenen in Gefäßmuskelzellen der Aorta reguliert wird [84].

Inwiefern die Freisetzung von Aldosteron durch Androgene beeinflusst wird, ist bislang nicht genau geklärt. Einige klinische Studien in menschlichen Populationen deuten auf geschlechtsspezifische Unterschiede in Aldosteron-Spiegeln hin, die wiederum mit Blutdruckunterschieden korrelieren [85, 86]. Dabei wurden bei jungen Frauen niedrigere Aldosteron-Spiegel beobachtet als bei altersgleichen Männern [85]. In einer anderen Studie jedoch unterschieden sich Aldosteron-Spiegel nicht wesentlich zwischen den untersuchten postmenopausalen Frauen und den Männern ähnlichen Alters [79]. In intakten bzw. mit Testosteronpropionat substituierten männlichen Ratten waren Aldosteron-Spiegel niedriger als bei orchietomierten Ratten [87]. Die durch Corticotropin (ACTH) stimulierte Freisetzung von Aldosteron

aus Zona glomerulosa-Zellen der Ratte sank außerdem nach Testosteron-Substitution [87].

1.2.2.2 Direkte Androgen-Effekte auf das renale Tubulussystem

Werden Ratten *in vivo* mit Androgenen mikroperfundiert, so zeigt sich, dass Androgene das RAAS des proximalen Nierentubulus auf direktem Weg stimulieren können [88]. Der genaue Mechanismus einer durch Testosteron induzierten Nierenschädigung ist noch immer unbekannt, doch eine erhöhte renale Natrium-Reabsorption im proximalen Tubulus hätte einen niedrigeren druckabhängigen Natriumverlust zur Folge und würde die Natriumkonzentration im Bereich der Macula densa herabsetzen [70]. Dies wiederum würde die Freisetzung von Renin stimulieren, den präglomerulären Widerstand herabsetzen und parallel zum Anstieg des arteriellen Blutdrucks möglicherweise Nierenschäden und Bluthochdruck hervorrufen. Abbildung 4 fasst die Wirkung von Androgenen auf die Niere zusammen.

1.2.3 Zentrale Blutdruckregulation

Weibliche SHR, die kurz nach der Geburt mit Testosteron behandelt worden sind, zeigen bei Behandlung mit Testosteron im Erwachsenenalter einen größeren Blutdruckanstieg als Kontroll-Weibchen [64]. Die neonatale Differenzierung von Hirnstrukturen, die in die Regulation des Blutdrucks verwickelt sind, könnte somit Grundlage für die Sensibilität des Blutdrucks gegenüber Androgenen im Erwachsenenalter sein. Androgene werden unter anderem in der Area postrema und in der präoptischen Region gebunden [89], die zum Teil verantwortlich sein sollen für Blutdruck und Herzfrequenz [90]. Geschlechtsspezifische Blutdruckunterschiede mögen daher teilweise Ergebnis einer unterschiedlichen Hirndifferenzierung zwischen den Geschlechtern sein, die sich schließlich auf die zentrale Blutdruckregulation auswirkt.

1.3 Epithelialer Natriumkanal (ENaC)

1.3.1 Struktur des ENaC

Der epitheliale Natriumkanal (ENaC) ist Angriffspunkt für das kaliumsparende Diuretikum Amilorid und Bestandteil der apikalen Zellmembran vieler Epithelien, welche Natrium absorbieren. In der Niere übernimmt der ENaC eine wichtige Funktion in der Natrium-Reabsorption im Aldosteron-sensiblen distalen Nephron (ASDN). Dieses besteht aus dem distalen Teil der Pars convoluta des distalen Tubulus, dem Verbindungsstück sowie dem kortikalen und medullären Abschnitt des Sammelrohrs [91]. Gemein ist diesen Abschnitten die Expression von ENaC, dem Mineralokortikoid-Rezeptor (MR) sowie der 11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11beta-HSD2) [92]. Letztere gewährt eine mineralokortikoide Selektivität für den MR, indem sie zirkulierende Glukokortikoide in deren inaktive Metabolite umwandelt und somit deren Bindung an den MR verhindert.

Der Natriumtransport über den ENaC ist elektrogen, depolarisiert die Zellmembran und bewirkt eine Kaliumsekretion über apikale Kaliumkanäle wie den ROMK (Renal Outer Medullary Potassium Channel) [93]. Über osmotische Kräfte wird außerdem ein transepithelialer Wassertransport über Vasopressin-abhängige apikale Wasserkanäle wie Aquaporin-2 (AQP-2) begünstigt [93]. Der ENaC hat somit Einfluss auf die Regulation des Elektrolythaushalts sowie des extrazellulären Volumens und damit auf den Blutdruck.

Der ENaC wird außer in der Niere ebenso im distalen Colon, in Schweiß- und Speicheldrüsen, im Epithel der Atemwege sowie im Alveolarepithel exprimiert [93, 94]. Während die Aufgabe des ENaC in Niere, Colon, Schweiß- und Speicheldrüsen besonders in der Gewährleistung eines ausgeglichenen Natrium-Wasserhaushaltes liegt, ist der Natriumkanal in der Lunge primär für die alveoläre Flüssigkeits-Clearance und die Regulierung der Viskosität des Mukus verantwortlich. Des Weiteren ist der ENaC in den Geschmacksknospen der Zunge zu finden, in denen er mit der Empfindung der Geschmacksqualität „salzig“ in Zusammenhang stehen soll. In Auge und Innenohr scheint der ENaC die molekulare Zusammensetzung von Kammerwasser und Endolymphe zu regulieren. Die Rolle des ENaC in Keratinozyten und Epithelzellen von Haarfollikeln ist bislang unklar.

Der Expressionsgrad der drei Untereinheiten des ENaC ist gewebsspezifisch [95-97]. Die Aktivität des ENaC hat direkten Einfluss auf die epitheliale Natrium-Reabsorption in der Niere, stellt indirekt eine treibende Kraft für die Kalium-Sekretion dar und wirkt sich über die Einstellung des Flüssigkeitshaushalts auf den Blutdruck aus [94, 98]. Der „Acid-sensing sodium channel“ (ASIC) ist dem ENaC in seiner Primärstruktur sehr ähnlich. Die kürzliche Identifizierung der Kristallstruktur des ASIC [99] lässt darauf schließen, dass der ENaC wahrscheinlich ein Heterotrimer aus drei Untereinheiten (alpha, beta, gamma) ist [100], die in ihrer Aminosäuresequenz zu ungefähr 30% homolog sind. Im menschlichen Organismus wurde eine vierte Untereinheit, delta-ENaC, gefunden, deren Bedeutung aber bislang unklar ist. Anders als beta- und gamma-Untereinheit ist die alpha-Untereinheit in der Lage, einen suffizienten Natrium-Fluss aufrecht zu erhalten, auch wenn sie isoliert exprimiert wird [101]. Beta- und gamma-ENaC verstärken den Natrium-Fluss, wenn sie mit alpha-ENaC koexprimiert werden. Die Inaktivierung des Gens für alpha-ENaC im Knockout-Mausmodell zeigt, dass die alpha-Untereinheit postnatal einen großen Stellenwert bei der pulmonalen Flüssigkeitsresorption hat. Jene Mäuse, die alpha-ENaC nicht exprimieren, sterben innerhalb von 40 h nach ihrer Geburt an respiratorischer Insuffizienz. Zusätzlich entwickeln sie eine metabolische Azidose [102]. Heterozygote Mutationen von alpha-ENaC im Mausmodell wirken sich hingegen nicht auf die Lungenfunktion aus. Die Mäuse sind in der Lage, Blutdruck und Natrium-Homöostase aufrecht zu erhalten, aber scheinen kompensatorisch die Expression von Angiotensin Typ 1-Rezeptoren heraufzuregulieren [103]. Nichtsdestotrotz wurden auch ENaC-Heteromere aus beta- und gamma-Untereinheit identifiziert, die in der Lage waren, einen Natrium-Fluss aufzubauen [101]. Inaktivierung von beta- und gamma-ENaC in Knockout-Mäusen führt früh zu Nierenfunktionsstörungen und innerhalb von 48 h nach der Geburt zum Tod [104, 105]. Es kommt zu renalem Natriumverlust, Kaliumretention, und vermehrter Aldosteron-Ausschüttung. Bei einer geringen residuellen Expression von beta- und gamma-ENaC entwickeln die Mäuse jedoch keinen pulmonalen Phänotyp, so dass davon auszugehen ist, dass die Kombination von alpha-beta-ENaC bzw. alpha-gamma-ENaC ausreicht, um eine Natrium- und Flüssigkeitsresorption im Lungenepithel zu gewährleisten. Des Weiteren gelang es, Mäuse zu entwickeln, in denen die Expression von alpha-ENaC selektiv im kortikalen Sammelrohr ausgeschaltet wird, nicht aber in den frühen

Segmenten des ASDN, nämlich in der Pars convoluta des distalen Tubulus und im Verbindungsstück [106]. Interessanterweise bewirkte diese gezielte Inaktivierung keine Veränderung der Natrium-Kalium-Balance oder des Flüssigkeitshaushaltes. Stattdessen besteht ein axialer Gradient bezüglich der alpha-ENaC Expression, welche im Verbindungsstück am höchsten ist und im Sammelrohr abnimmt. Bei Nagetieren, die salzreich ernährt werden und niedrige Aldosteron-Spiegel aufweisen, sind die Untereinheiten des ENaC an der luminalen Membran kaum detektierbar und im Wesentlichen in intrazellulären Vesikeln lokalisiert [96, 107]. Bei einer Standard-Diät mit moderaten Aldosteron-Spiegeln im Serum findet man die ENaC-Untereinheiten an der luminalen Zellmembran von spätem distalem Tubulus und in proximalen Teilen des Verbindungsstücks. In den distaleren Segmenten verbleiben vor allem beta- und gamma-ENaC ausschließlich in intrazellulären Vesikeln. Steigen Aldosteron-Spiegel unter einer salzarmen Diät stark an, so kann der ENaC an der luminalen Membran des gesamten ASDN lokalisiert werden. Generell wird der ENaC trotzdem stärker in den frühen als in den distalen Abschnitten des ASDN exprimiert. Patch-Clamp Experimente konnten dieses Konzept bestätigen, indem gezeigt wurde, dass der Amilorid-sensitive Strom vom Verbindungsstück bis zum distalen Sammelrohr abnimmt [108]. Das kortikale Sammelrohr scheint somit geringere Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der Homöostase als das proximale ASDN zu besitzen und könnte vor allem dann wichtig werden, wenn die vorherigen Abschnitte des ASDN eine suffiziente Natriumresorption nicht mehr gewährleisten können und Aldosteron-Spiegel stark ansteigen [109].

1.3.2 Funktion des ENaC und Regulatoren

Die Rolle des ENaC in der Regulation des Blutdrucks wird durch seltene genetische Anomalien in den SCNN1-Genen verdeutlicht, welche für die einzelnen Untereinheiten des ENaC kodieren (alpha: SCNN1A, beta: SCNN1B, gamma: SCNN1G) [110, 111]. Beim Liddle-Syndrom liegen Mutationen und/ oder Deletionen im PY-Motiv des zytosolischen C-Terminus der beta- oder gamma-Untereinheit des ENaC vor. Ubiquitin-Proteinligasen wie Nedd4-2, welche über ihre WW-Domänen mit dem PY-Motiv interagieren und für eine Internalisierung des Natriumkanals von der luminalen Zellmembran und damit für eine funktionelle Inaktivierung des ENaC verantwortlich sind, werden so gehemmt [112]. Dies führt zu einer Überfunktion des

Natriumkanals (Gain-of-Function Mutation) und somit zu Natriumretention, Hypokaliämie, metabolischer Alkalose und einer schweren Form der arteriellen Hypertonie. Der Pseudohypoaldosteronismus Typ 1 (PHA-1) zeichnet sich hingegen durch eine Mutation im Gen einer der drei ENaC-Untereinheiten aus, die einen Funktionsverlust des Kanals (Loss-of-function Mutation) und somit einen renalen Natriumverlust und ein hypotensives Syndrom zur Folge hat.

Aldosteron gilt als einer der wichtigsten Regulatoren des ENaC. Das Mineralokortikoid bindet an den MR, woraufhin Zielgene wie alpha-ENaC und die Serum-und-Glukokortikoid-regulierte Kinase 1 (SGK1) aktiviert werden (Abb. 5). SGK1 erhöht die Natriumresorption, indem sie unter anderem die Natrium-Kalium-

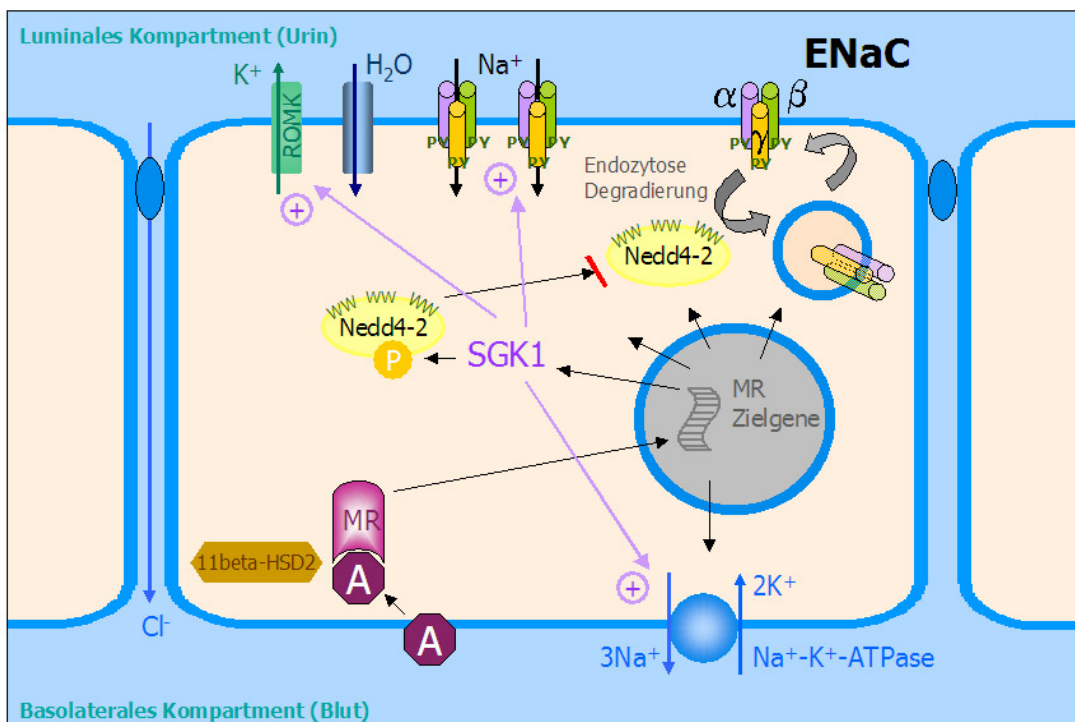


Abbildung 5: Wirkung von Aldosteron auf den distalen Tubulus. Aldosteron bindet an den Mineralokortikoid-Rezeptor (MR) und bewirkt einen Anstieg von MR-Zielgenen, wie zum Beispiel von alpha-ENaC, dem Kaliumkanal ROMK (Renal Outer Medullary Potassium Channel) oder der Serum-und-Glukokortikoid-regulierten Kinase 1 (SGK1). SGK1 inaktiviert die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 durch Phosphorylierung und verhindert damit eine durch Nedd4-2 vermittelte Endozytose des ENaC. Auf diese Weise nimmt der Natriumfluss über den ENaC zu. Da auch Glukokortikoide an den MR binden können, schützt die Inaktivierung von Cortisol zu Cortison durch die 11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11beta-HSD2) vor einer Glukokortikoid-vermittelten Stimulation des MR. Modifizierte Abbildung aus eigener Publikation [31].

ATPase (Na⁺-K⁺-ATPase) und den Kaliumkanal ROMK zu aktivieren scheint, die Zahl aktiver ENaC-Einheiten an der Zellmembran durch Phosphorylierung und Inhibierung von Nedd4-2 erhöht [111, 113] sowie indem sie alpha-ENaC direkt beeinflusst [114, 115].

In neonatalen MR Knockout-Mäusen unterscheidet sich die renale Expression der einzelnen ENaC-Untereinheiten nicht von der von Wildtyp-Mäusen. Werden die MR Knockout-Mäuse jedoch durch die Substitution von NaCl am Leben gehalten, sinkt die renale alpha-ENaC Expression um 40%, während die beta- und gamma-Untereinheit in der Niere weiterhin unverändert exprimiert wird [114, 116]. Supraphysiologische Konzentrationen von Glukokortikoiden aktivieren den GR im ASDN und können durch eine gesteigerte Expression von alpha-ENaC einen Mangel des MR in diesen Tieren kompensieren.

Die Regulierung der einzelnen ENaC-Untereinheiten durch Aldosteron ist ausgesprochen gewebsspezifisch und abhängig von der untersuchten Spezies. In der epithelialen Zelllinie A6, die aus der Niere des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) stammt, ist kein Effekt von Aldosteron auf den ENaC zu beobachten [117]. Im Darm von Vögeln werden alpha- und beta-ENaC durch eine Salzrestriktion stimuliert [118]. Im distalen Colon der Ratte stimuliert Aldosteron die Expression von beta- und gamma-ENaC, während es keinen Einfluss auf die alpha-Untereinheit besitzt [119]. Im renalen Kortex derselben Tiere hat Aldosteron hingegen eine moderat stimulierende Wirkung auf alpha-ENaC mRNA. Die beta- und gamma-Untereinheit der Niere wird durch Aldosteron in diesem Rattenmodell nicht reguliert. Die Stimulation der beta- und gamma-Untereinheit im Colon [120] und der alpha-Untereinheit in der Niere [121] erfolgt innerhalb von 1-2 h nach Aldosteron-Stimulation. In Bezug auf alpha-ENaC erfolgt die Regulation über den MR und die Bindung an ein imperfektes Glukokortikoid-responsives Element (GRE) in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) [122]. Interessanterweise bewirkt Vasopressin in der Rattenniere eine Induktion von beta- und gamma-ENaC, wodurch der Aldosteron-Effekt ergänzt werden kann [123]. Neben Aldosteron und Glukokortikoiden, welche insbesondere bei der Regulation des ENaC in der Lunge Bedeutung haben, sowie Vasopressin sind unter anderem auch Insulin [124], Angiotensin II [125] und Wachstumshormon [126] in der Lage, die Aktivität des ENaC zu regulieren. Weitere Regulatoren sind extrazelluläre Proteasen wie Kallikrein und CAP-1 (Channel-

activating protease-1), intra- und extrazelluläre Ionenkonzentrationen, z.B. von Natrium und Calcium, der osmoläre Gradient sowie die tubuläre Flussrate [125]. Der Einfluss von Geschlechtshormonen auf die Expression der ENaC-Untereinheiten wurde bislang nicht detailliert untersucht.

1.4 Androgen-Rezeptor (AR)

1.4.1 Struktur und Funktion

Der AR gehört zur Familie Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktoren, die sowohl andere Steroidhormon-Rezeptoren, den Schilddrüsenhormon-Rezeptor als auch den Vitamin D₃-Rezeptor umfasst. Der AR wird in vielen Geweben exprimiert, so zum Beispiel in männlichen und weiblichen Geschlechtsorganen, in Muskel, Leber, Hypophyse, Nebennierenrinde, Schilddrüse und Hirn, aber auch auf Gefäßzellen, kardialen Myozyten und in den Nieren, dort vor allem im proximalen und distalen Tubulus, doch auch im Glomerulum selbst und im kortikalen Sammelrohr [32, 67, 127-130]. Testosteron ist das vorherrschende zirkulierende Androgen im Menschen und wird durch 5alpha-Reduktase Typ 2 in 5alpha-DHT (DHT) umgewandelt. DHT bindet mit höherer Affinität als Testosteron an den AR, welcher daraufhin Dimere bildet. Der Rezeptor-Ligand-Komplex wird in den Zellkern transloziert und induziert bzw. supprimiert dort über Bindung an ein Hormon-responsives Element (HRE), welches sich meist im Promoter des jeweiligen Gens befindet, aber auch in der kodierenden Region des Gens liegen kann, die Transkription Androgen-responsiver Gene [131, 132].

1.4.2 Autoregulation des AR

Es ist bekannt, dass der AR durch Androgene autoreguliert werden kann. Dieser Prozess ist jedoch äußerst gewebsspezifisch und abhängig von der untersuchten Spezies sowie von ihrem Entwicklungsstadium [133-135]. Die Herunterregulation von AR mRNA durch Androgene ist unter anderem in der ventralen Prostata, in Nebenhoden, Niere und Hirn beschrieben [136]. Doch auch die Androgen-induzierte Heraufregulation von AR mRNA wurde beobachtet, beispielsweise in glatten Muskelzellen des Penis der Ratte [137], im Hippocampus [138], in Vorläuferzellen des Fettgewebes oder Fibroblasten des Geschlechtstraktes [135].

1.5 Ziele der Arbeit

Die Funktion von distalem Tubulus und Sammelrohr der Niere kann durch Aldosteron gesteuert werden und stellt einen wichtigen Kontrollpunkt in der Regulierung der renalen Natrium-, Kalium- und Wassersekretion dar. Interessanterweise ist der ENaC nicht nur Angriffspunkt für Aldosteron, sondern scheint unter anderem auch durch Androgene reguliert zu werden. Vorangegangene Studien von Quinkler et al. haben zeigen können, dass Testosteron die Expression der alpha-Untereinheit des ENaC in der menschlichen Nierenzelllinie (HKC-8) *in vitro* stimuliert [139]. Die menschliche Nierenzelllinie HKC-8 zeigt ein typisches Expressionsmuster des distalen Tubulus (z.B. MR, SGK1, 11beta-HSD2), besitzt aber auch Charakteristika des proximalen Tubulus (z.B. NHE3). Sie exprimiert sowohl den AR als auch die alpha-Untereinheit des ENaC, aber nicht beta- und gamma-ENaC. Inkubation mit Testosteron, im Gegensatz zu DHT, stimuliert die Expression von alpha-ENaC mRNA in diesen Zellen *in vitro* [139]. Dieser Effekt ist abhängig vom AR und wird durch den AR-Antagonisten Flutamid aufgehoben. Die Androgen-abhängige Regulation des ENaC könnte zum Teil zu den geschlechtsspezifischen Blutdruckunterschieden beitragen und ist Gegenstand dieser Arbeit. Dennoch müssen mögliche Blutdruckdifferenzen zwischen den Geschlechtern stets als Summen-Effekte betrachtet werden, beachtet man die oben beschriebenen vielfältigen Regulationsmechanismen in den verschiedenen Organsystemen durch Geschlechtshormone.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *in vivo* Rattenmodell zu Hilfe genommen, um den Einfluss von Geschlechtshormonen, d.h. Androgenen und Estradiol, auf die Expression der ENaC-Untereinheiten sowie den AR in Männchen und Weibchen genauer zu untersuchen. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Untersuchung der Androgen-Wirkung gelegt. Zusätzlich wurden renale Zelllinien der Maus (M1) und der Ratte (RCCD2) hinsichtlich ihrer Regulation durch Aldosteron und Androgene untersucht. Außerdem wurde die Expression der ENaC-Untereinheiten auf Zellen einer primären Gefäßmuskelzelllinie der Ratte (VSMC) analysiert und ein Androgen-Effekt auf den ENaC in diesem System evaluiert. Folgende Fragestellungen galt es zu überprüfen:

1. Zeigen sich zwischen gonadektomierten weiblichen und männlichen Ratten Unterschiede hinsichtlich der basalen Expression der einzelnen ENaC-Untereinheiten und des AR in der Niere?
2. Werden die einzelnen ENaC-Untereinheiten durch Geschlechtshormone reguliert und ist dieser Vorgang geschlechtsabhängig? Spiegeln sich Änderungen in der mRNA-Expression auf Protein-Ebene wider?
3. Hat das Geschlecht einen Einfluss auf die Autoregulation des AR in der Niere im Rattenmodell? Geht eine Expressionsänderung des AR auf mRNA-Ebene ebenso mit einer Expressionsänderung des AR-Proteins einher?
4. Gibt es potentielle Regionen im Promoter der untersuchten Zielproteine, die eine Regulation durch Geschlechtshormone erklären?
5. Sind die gewählten Zelllinien geeignete Modelle, um die Steuerung der einzelnen ENaC-Untereinheiten durch Geschlechtshormone zu untersuchen? Wird der AR auf den Zellen exprimiert?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien und Medien

Zelllinien

- M1 kortikale Sammelrohr-Zelllinie aus der Spezies Maus (LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland)
- RCCD2 kortikale Sammelrohr-Zelllinie aus der Spezies Ratte (Rat Cortical Collecting Duct) (zur Verfügung gestellt von Prof. Brian J. Harvey, Royal College of Surgeons in Ireland, Dublin, Irland)
- VSMC primäre Zelllinie glatter Gefäßmuskelzellen aus der Aorta der Spezies Ratte (zur Verfügung gestellt von PD Dr. med. Anette Fiebeler, Charité Campus Buch, Berlin, Deutschland)

Zellmedien

DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle Medium/ Ham's Nutrient Mix F-12 1:1, mit L-Glutamin, 15 mM HEPES, ohne Phenolrot)	Gibco, Grand Island, NY, USA
Fetales Rinderserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco, Grand Island, NY, USA
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02% in PBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin/ EDTA 4NA-Lösung (0,25%/1mM)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Tabelle 1: Zellmedien

2.1.2 Längenstandards, Primer, Enzyme, Antikörper

DNA- und Protein-Längenstandards, Protein-Konzentrationsstandard

- HyperLadder I (200 – 10000 bp) Bioline, Luckenwalde, Germany
- Precision Plus ProteinTM Standard (10 – 250 kDa) Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- Protein Standard II Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Primer für die semiquantitative PCR

Zielgene	Produktgröße (bp)	Primer-Sequenz (vorwärtslaufender Primer, rückwärtslaufender Primer)	Hersteller
Alpha-ENaC	492	5'-TCCAATCTCTGGATGTCCTC, 5'-CTTCCGACACTTGGAGAAAC	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Beta-ENaC	401	5'-TTCCAAGACCACATGATCCA, 5'-CCACCCAGGTTAGAGAGCAG	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Gamma-ENaC	598	5'-CTGCTTCTTCGATGGGATGT, 5'-GCTACAGGATTGCTTGCACA	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
AR	557	5'-GGCAAAGGCACTGAAGAGAC, 5'-GCAGAGAAGTCACCCTCCTG	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

Tabelle 2: Primer für die semiquantitative PCR. Alle angegebenen Primer für die Spezies Ratte.

Endogene Kontrolle (18S): Classic II Internal Standards, Ambion, Austin, TX, USA

Primer für die Realtime-PCR

(nachfolgende Primer als „Assays on Demand“ von Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Ratte:

Alpha-ENaC (sodium channel, non-voltage gated, type I), Rn00580652_m1
 Beta-ENaC (sodium channel, non-voltage gated, type I), Rn00561892_m1
 Gamma-ENaC (sodium channel, non-voltage gated, type I), Rn00566891_m1
 Androgen-Rezeptor, Rn00560747_m1
 Erythropoetin, Rn01481376_m1

Maus:

Alpha-ENaC (sodium channel, non-voltage gated, type I), Mm00803386_m1
 Beta-ENaC (sodium channel, non-voltage gated, type I), Mm00441215_m1
 Gamma-ENaC (sodium channel, non-voltage gated, type I), Mm00441228_m1
 Androgen-Rezeptor, Mm00442688_m1

Endogene Kontrolle:

18S: TaqMan[®] Ribosomal RNA Control Reagents (VIC Probe), Applied Biosystems Foster City, CA, USA

Enzyme

AMV Reverse Transcriptase (HC) (20 U/μl)	Promega, Madison, WI, USA
Rnasin [®] Ribonuclease Inhibitor (40 U/μl)	Promega, Madison, WI, USA
Taq DNA Polymerase in Storage Buffer B (5 U/μl)	Promega, Madison, WI, USA
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix (3 mM Mn[Oac] ₂ , 200 μM dNTPs, 1,25 U AmpliTaq Gold Polymerase, 1,25 U AmpErase UNG)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Tabelle 3: Enzyme

Primäre Antikörper

Anti-alpha-ENaC (PA1-920) Affinity BioReagents, Golden, CO, USA
 Anti-beta-ENaC (L558) Labor von Prof. Carolyn A. Ecelbarger, Georgetown University, Washington, DC, USA
 Anti-gamma-ENaC (L550) Labor von Prof. Carolyn A. Ecelbarger, Georgetown University, Washington, DC, USA
 Anti-AR (N-20) Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA

Sekundäre Antikörper

Goat anti-rabbit IgG-Horseradish Peroxidase Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK

Neutralisierende Peptide

PA1-920 Neutralizing Peptide Affinity BioReagents, Golden, CO, USA
 AR Blocking Peptide sc-816 P Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA

2.1.3 Kommerzielle Reaktionssysteme

2-D ReadyPrep™ Extraction Kit (Total Protein)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
DC™ Protein Assay (Reagenz A, B, S)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
ECL Western blotting detection reagents and analysis system, RPN2108	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Reverse Transcription System	Promega, Madison, WI, USA
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 4: Kommerzielle Reaktionssysteme

2.1.4 Chemikalien und Biochemikalien

2-D Rehydratations/Sample-Puffer 1 (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1% (w/v) ASB-14 Detergenz, 40 mM Tris Base, 0,001% Bromphenolblau)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
2-Mercaptoethanol (beta-Mercaptoethanol)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
30% Acrylamide/Bis Solution 29:1 (145 g Acrylamid, 5 g N,N'-Methylene-bis-acrylamid)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
5alpha-Dihydrotestosteron (5alpha-Androstane-3,17-dione)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Aldosteron	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Amiloride hydrochloride hydrate	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Bio-Lyte® 3/10 Ampholyte Buffer	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Boric acid, ACS reagent	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Complete Mini Protease Inhibitor	Roche, Penzberg, Deutschland
Coomassie-Brillantblau R250	Merck, Darmstadt, Deutschland
DEPC treated water (DEPC-H ₂ O)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
ECL Advance Blocking Reagent	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
EDTA (0,5 M)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Estradiol	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

Materialien und Methoden

Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ficoll	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Flutamid	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Formestan	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂ (25 mM)	Promega, Madison, WI, USA
NaCl (Sodium chloride)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
NaOH (2 M)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdesoxycholat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
PCR Nucleotide Mix (40 mM)	Promega, Madison, WI, USA
Phosphate Buffered Saline Tablette (1 Tablette in 200 ml H ₂ O _{bidest} 0,01 M Phosphatpuffer, 0,0027 M KCl, 0,137 M NaCl, pH 7,4 bei 25 °C)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Random Primers (500 µg/ml)	Promega, Madison, WI, USA
Reverse Transcription 10x Buffer	Promega, Madison, WI, USA
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
SDS-Solution 10% (w/v)	Promega, Madison, WI, USA
Set of dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM)	Promega, Madison, WI, USA
TBP Reduktions-Agens (200 mM Tributylphosphin (TBP) in 1-Methyl-2- Pyrrolidinon)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
TEMED (N,N,N,N'-Tetra-methyl- ethylenediamine)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Testosteron	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Thermophilic DNA Poly 10x Buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1,0% Triton X-100)	Promega, Madison, WI, USA
Tris, buffered	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Tris-Base (Trizma-Base)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Tris-HCl (Trizma hydrochloride)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Tween 20, SigmaUltra	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

Vistra Green Nucleic Acid Stain	Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK
Xylen Cyanol FF	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

Tabelle 5: Chemikalien und Biochemikalien

2.1.5 Standardpuffer und -lösungen

0,05% PBS-Tween (PBS-T)	2000 ml H ₂ O _{bidest} , 1 ml Tween 20, 10 Phosphate Buffered Saline Tablets
0,1% PBS-Tween (PBS-T)	2000 ml H ₂ O _{bidest} , 2 ml Tween 20, 10 Phosphate Buffered Saline Tablets
1,5% Ammoniumpersulfat	0,15 g Ammoniumpersulfat in 10 ml mit Millipore-Ionenaustauscheranlage gefiltertem H ₂ O
2x Probenpuffer für Western Blot	1,25 ml 3 M Tris (pH 8,8), 2 ml 10% SDS, 1 ml Glycerol, 0,25 Millipore-gefiltertes H ₂ O, 0,5 ml beta-Mercaptoethanol
5% BSA	40 ml 0,05% PBS-Tween, 2 g Bovine serum albumin (BSA)
5% ECL Advance Blocking Reagent	40 ml 0,05% PBS-Tween, 2 g ECL Advance Blocking Reagent
5x SDS-PAGE-Laufpuffer	15 g Tris-Base, 72 g Glycin, 5 g SDS, 1 l H ₂ O _{bidest}
Entfärbelösung	60 ml Methanol, 20 ml Essigsäure, 220 ml H ₂ O _{bidest}
Färbelösung	0,1 g Coomassie-Brillantblau, 45 ml Methanol, 45 ml Essigsäure, 100 ml H ₂ O _{bidest}
Ficoll-Puffer	100 ml DEPC-H ₂ O, 15 g Ficoll, 0,25 g Bromphenolblau, 0,25 g Xylen Cyanol FF
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% Igepal, 0,5% Natrium-Desoxycholat, 0,1% SDS, Complete-Mini Protease Inhibitor (1 Tablette auf 10 ml Lösung)
5x SDS-PAGE-Laufpuffer	15 g Tris-Base, 72 g Glycin, 5 g SDS, 1 l H ₂ O _{bidest}
TBE-Puffer	Gesamtvolumen 1l: 10,8 g Tris-Base, 5,5 g Boric Acid, 4 ml EDTA (0,5 M), 996 ml H ₂ O _{bidest}
Transfer-Puffer (Toubin-Puffer)	3,03 g Trizma Base, 14,4 g Glycin, 200 ml Methanol, 800 ml H ₂ O _{bidest}

Tris (3 M, pH 8,8)	36,6 g Tris-Base in 100 ml mit Millipore-Ionenaustauscheranlage gefiltertem H ₂ O, pH mit HCl eingestellt
Tris (0,5 M, pH 6,8)	6 g Tris-Base in 100 ml mit Millipore-Ionenaustauscheranlage gefiltertem H ₂ O, pH mit HCl eingestellt

Tabelle 6: Standardpuffer und -lösungen

2.1.6 Laborgeräte

Analysenwaage Sartorius BP 121 S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Analysenwaage Scout SPU2001	Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA
CO ₂ -Brutschrank HeraCell	Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland
Elektrophoreseapparatur MGU-302	C.B.S. Scientific Co., Del Mar, CA, USA
Film-Entwicklungsautomat Kodak X-OMAT Multiloader 300 Plus	Kodak AG, Stuttgart, Deutschland
Gefrierschrank Sanyo Ultra-Low MDF-U50V	Sanyo Electric Biomedical Co., Osaka, Japan
Gelherstellungsapparatur (Casting Stand and frame)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Heizblock Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heizblock Heidolph MR 3002S	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Image Scanner	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Kühl-Gefrierschrank Liebherr Premium (+4 °C, -20 °C)	Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland
Magnetrührer Reverstir Model RS-8	Toyo Kagaku Sangyo Co., Ltd., Tokyo, Japan
Mikrowellenofen Micromaxx MM41580	Medion, Essen, Deutschland
Millipore-Ionenaustauscheranlage Milli-Q	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Multipipette Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Netzteil Model 1000/500 PowerSupply	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Netzteil Model 200/2.0 PowerSupply	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
PCR-Cycler Eppendorf Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter pH211 Microprocessor pH Meter	HANNA Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland

Materialien und Methoden

Pipetten Eppendorf Reference 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Macro	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
qPCR-Cycler iCycler iQ	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Röntgenfilmkassette Hypercassette RPN1642	Amersham Life Science, Little Chalfont Buckinghamshire, UK
Schwenkbank Rocky RT-1	Biometra – biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
SDS-PAGE-Apparatur Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Semidry-Elektroblotting-Apparatur Trans-Blot SD, Semi-dry Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Spectrophotometer Genesys 10 UV/Vis	Thermospectronic, Rochester, NY, USA
Sterile Werkbank HERAsafe LaminAir HB2448	Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland
Typhoon 8600 Variable Mode Imager	Amersham Biosciences, Little Chalfon Buckinghamshire, UK
Ultraschall-Homogenisator Labsonic M	B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland
Vortex VWR Mini Vortexer VM-3000	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad VWR 1228-2E	Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA
Xenox Motorhandstück MHX (E)	Proxxon Zentralservice, Warberg/Aist, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 7: Laborgeräte

2.1.7 Molekularbiologische Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

Cell Scraper 3010 Costar	Corning Inc., Corning, NY, USA
Einmal-UV-Küvette Plastibrand® mikro (70 µl)	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Falcon Rundbodenröhrchen (5 ml)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA

Materialien und Methoden

Hybond ECL Nicrocellulose Membrane RPN2020D	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Little Chalfon Buckinghamshire, UK
Kryo-Tubes (1,8 ml)	Nunc, Roskilde, Dänemark
PCR iCycler PCR Plates, 96 wells	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
PCR Sealer Microseal 'B' Film	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Pergaminpapier (100x100 mm)	Schleicher & Schuell Microscience GmbH, Dassel, Deutschland
Pipettenspitzen 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PYREX Borosilicat Glas Reaktionsröhrchen	Corning Inc., Corning, NY, USA
Safe-Lock Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten Falcon (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Short und Spacer Glasplatten Mini-Protean 3	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Thermo-Tube (0,2 ml)	Abgene House, Epsom, Surrey, UK
Wägeschälchen Diamant (25 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Whatman GB005 Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell Microscience GmbH, Dassel, Deutschland
Zentrifugenröhrchen mit Schraubkappen (15 ml, 50 ml)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 8: Molekularbiologische Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

2.1.8 Software

Endnote Version 9.0.0, Thomson Scientific, New York, NY, USA
GraphPad Prism 4, Version 4.01, GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Image Master Labscan Version 3.00, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Image Master TotalLab Version 1.11, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Image Quant Version 5.1, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Microsoft Office 2002, Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
NCBI National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
Primer3 Design Program (http://primer3.sourceforge.net)
TESS Transcription Element Search System (http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess)

Tabelle 9: Software

2.2 Methoden

2.2.1 Expressionsstudien *in vitro*

2.2.1.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Zur Untersuchung der Regulation des epithelialen Natriumkanals in Nierenzellen durch Androgene *in vitro* wurden in dieser Arbeit Versuche mit einer kortikalen Sammelrohr-Zelllinie der Spezies Maus (M1) und einer der Spezies Ratte (RCCD2, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Brian J. Harvey, Royal College of Surgeons in Ireland, Dublin, Irland) sowie mit einer primären glatten Gefäßmuskelzelllinie aus der Aorta der Spezies Ratte (VSMC, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. med. Anette Fiebeler) durchgeführt. Die Zellen wurden unter kontrollierten und sterilen Bedingungen im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% in Standard-Kulturmedium (500 ml DMEM/F12 (Gibco) und 26,3 ml (5%) fetalem Rinderserum (FCS) (Biochrom AG)) in 75 cm²-Flaschen kultiviert, bis sie zu ca. 80% konfluent waren. Zellen der Zelllinie VSMC wurden mit 10% FCS kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 2 – 3 Tage unter einer sterilen Werkbank, indem das Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, die Zellen mit sterilem PBS (Gibco) zweimalig gewaschen und mit 0,05%/0,02% Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom AG) bzw. bei VSMC-Zellen mit 0,25% Trypsin/1 mM EDTA 4Na (Gibco) vom Flaschenboden gelöst wurden. Im Folgenden wurden die Zellen in Standard-Kulturmedium aufgenommen und im Verhältnis 1:4 bis 1:10 in neue Zellkulturflaschen überführt. Für die einzelnen *in vitro* Experimente wurden Zellpassagen von P5 – P20 verwendet.

2.2.1.2 Stimulation von Zellen

Für die Versuche wurden die Zellen in 25 cm²-Flaschen überführt, so dass jede Flasche 1 ml (ca. 10⁵ Zellen) Zellsuspension in Standard-Kulturmedium enthielt. 24 – 48 h nach Umsetzen der Zellen wurde das Standard-Kulturmedium durch Medium ersetzt, dem statt normalem FCS mit Aktivkohle behandeltes FCS

(hergestellt durch Inkubation mit Aktivkohle-Dextran-Lösung für 30 min bei 50°C, Zentrifugation mit 10000 g für 30 min bei 4°C und Sterilfiltration) zugesetzt worden war, um den Einfluss von anderen Steroiden auf die Versuche auszuschließen. Abhängig vom jeweiligen Versuch wurde dem Versuchsmedium zudem Testosteron (Sigma-Aldrich) in einer finalen Konzentration von 10^{-10} M – 10^{-6} M (5 µl des jeweiligen Stimulus auf 5 ml Versuchsmedium), DHT (Sigma-Aldrich) von 10^{-6} M – 10^{-10} M, Flutamid (Sigma-Aldrich) 10^{-5} M, Estradiol (Sigma-Aldrich) von 10^{-10} M – 10^{-8} M, Formestan (Sigma-Aldrich) 10^{-6} M, Aldosteron (Sigma-Aldrich) von 10^{-7} – 10^{-11} , Spironolacton 10^{-7} M (Sigma-Aldrich) oder Ethanol zugesetzt und die Zellen für 24 bzw. 48 h im Brutschrank inkubiert.

2.2.2 Expressionsstudien in vivo

Alle beschriebenen Tierexperimente wurden gemäß gemeingültiger Standards humaner Tierhaltung wie dem „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ der National Institutes of Health (NIH) im Institut für Endokrinologie der Universität Würzburg (Leitung Prof. Dr. Bruno Allolio), Deutschland durchgeführt. 12 männliche und 25 weibliche Wistar-Ratten im Alter von 8 – 10 Wochen und einem Körpergewicht (KG) von 180 – 200 g wurden von Charles River Breeding Laboratories (Kisslegg, Deutschland) erworben. Die Tiere erhielten Wasser und reguläres Rattenfutter *ad libitum*. An Tag 0 wurden die männlichen Wistar-Ratten orchiektomiert und ab Tag 7 mit einem langanhaltenden Testosteron-Präparat (Testosteron-Undecanoat, 500 mg/kg KG als einmalige Injektion, Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena, Deutschland), mit einem 5alpha-Dihydrotestosteron-Präparat (75 mg pro Pellet bei 21-tägiger Freisetzung, Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA) oder mit Placebo in Form einer intramuskulären Injektion von Rizinusöl behandelt. Jede männliche Tiergruppe bestand aus 4 Tieren (n=4). Die weiblichen Wistar-Ratten wurden mit einem langanhaltenden Testosteron-Präparat (Testosteron-Undecanoat, 100 oder 500 mg/kg KG), mit einem 5alpha-Dihydrotestosteron-Präparat (75 mg pro Pellet bei 21-tägiger Freisetzung), mit einem Estradiol-Präparat (1 mg pro Pellet bei 90-tägiger Freisetzung, Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA) oder mit Placebo (intramuskuläre Injektion von Rizinusöl) behandelt. Wegen der physiologisch geringeren Konzentration von Testosteron im Serum weiblicher Tiere, war im Vergleich zu den Männchen bei den Weibchen eine

zweite, niedrigere Testosteron-Dosis (Testosteron-Undecanoat 100 mg/kg KG) gewählt worden. Die weiblichen Gruppen bestanden aus jeweils 5 Tieren (n=5). Nach 14 Tagen wurden die Tiere getötet, ihre Nieren entnommen und Blutserum gewonnen. Das Nierengewicht beider Nieren sowie das Gesamt-Körpergewicht wurden bestimmt. Die entnommenen Gewebe wurden bei -80°C gelagert. Die Serumspiegel der einzelnen Hormone wurden mittels Immunoassays in den Laboratorien der Universitätsklinik Würzburg gemessen. Gesamt-Testosteron wurde mit Hilfe eines RIAs (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) bei einer Sensitivität von 0,06 ng/ml und einer intra- sowie inter-Assay-spezifischen Variabilität von 6-15% bzw. 9-16% bestimmt. DHT-Serumspiegel wurden ebenfalls mittels RIA (Diagnostic Systems Laboratories, Sinsheim, Deutschland) bestimmt, der eine Sensitivität von 0,004 ng/ml besaß und eine intra- sowie inter-Assay-spezifische Variabilität von 3-6% und 5-12%. Der RIA zur Messung von 17beta-Estradiol-Serumspiegeln (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) besaß eine Sensitivität von 3,5 pg/ml.

2.2.3 Isolierung von RNA

Die Nieren männlicher und weiblicher Wistar-Ratten wurden freundlicherweise von Prof. Allolio, Universität Würzburg, für dieses Projekt zur Verfügung gestellt. Gesamt-RNA wurde aus Gesamt-Nierengewebe mittels Säulenextraktion gemäß Herstelleranweisungen isoliert (RNeasy[®] Mini Kit, Qiagen). Ca. 30 mg Gewebe eines Nieren-Querschnitts jeder Probe wurde in 350-700 µl RLT-Puffer aufgenommen, welcher zuvor mit beta-Mercaptoethanol (10 µl pro 1 ml RLT-Puffer) versetzt worden war. Das Gewebe wurde mit einem Xenox Motorhandstück (Proxxon) für ca. 30 s bei etwa 10000 Umdrehungen homogenisiert, das Homogenisat ungekühlt für 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand für die weitere Verarbeitung genutzt. Den Proben wurde das gleiche Volumen 70%igen Ethanol wie anfangs RLT-Puffer hinzugegeben und die Lösung gut gemischt. Maximal 700 µl dieses Gemisches wurden auf eine RNeasy[®] Mini-Säule aufgetragen und für 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Eluat, welches im Sammelgefäß aufgefangen worden war, wurde verworfen und der Vorgang wiederholt, sollte noch Gewebe in RLT/ 70%igem Ethanol vorhanden sein. Danach wurden 700 µl RW1-Puffer auf die Säule aufgetragen und diese erneut für 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Eluat und Sammelgefäß wurden

verworfen und die RNeasy[®] Mini-Säule auf ein neues Sammelgefäß aufgesetzt. Pro Säule wurden nun 500 µl RPE-Puffer aufgetragen und für 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und der Vorgang wiederholt. Nach diesem Schritt wurde für 2 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die RNeasy[®] Mini-Säule nochmals für 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Eluat und Sammelgefäß wurden nun verworfen und die RNeasy[®] Mini-Säule auf ein steriles Eppendorf-Gefäß aufgesetzt. 30 µl RNase-freies Wasser wurden direkt auf die Membran der RNeasy[®] Mini-Säule aufgetragen und das Gefäß nochmals für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde erneut auf die Membran der RNeasy[®] Mini-Säule aufgetragen und zentrifugiert. Anschließend wurde die RNeasy[®] Mini-Säule verworfen. Das Eluat enthielt die isolierte Gesamt-RNA der einzelnen Proben.

Gesamt-RNA aus Zellkulturexperimenten wurde ebenfalls mittels Säulenextraktion isoliert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 350 µl RLT-Puffer/ beta-Mercaptoethanol pro 25 cm²-Kulturflasche zugesetzt. Die Zellen wurden mit einem Cell Scraper (Costar, Corning Inc.) vom Boden gelöst und die Zellsuspension in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Mit Hilfe eines Xenox Motorhandstücks (Proxxon) wurden die einzelnen Proben für 30 s homogenisiert. Nach Hinzusetzen von 350 µl 70%igen Ethanol wurde das Gesamtvolumen auf eine RNeasy[®] Mini-Säule übertragen und wie oben beschrieben Gesamt-RNA isoliert.

Die Integrität und Qualität der RNA wurde durch eine elektrophoretische Auftrennung auf 1%igem Agarosegel überprüft. Die quantitative Analyse der isolierten RNA erfolgte spektrophotometrisch in Einmalküvetten (Plastibrand[®] UV-Küvette mikro, Brand, Wertheim, Deutschland) bei optischer Dichte von 260 nm in einem Genesys 10 UV/Vis Spektrophotometer (Thermospectronic). Als nächstes wurden mit Hilfe des Reverse Transcription System (Promega) 2 – 5 µg der RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Durch Erhitzung der RNA auf 70°C für 10 min wurde diese denaturiert. 30 U Reverse Transkriptase aus Avian Myeloblastosis Virus (AMV-RT), 1 µg Random Hexamers, 1 µl Ribonuclease Inhibitor und 40 nmol deoxy-NTPs (PCR Nucleotide Mix) wurden zusammen mit 4 µl 10x Reaktionspuffer, 8 µl MgCl₂ und einem entsprechenden Volumen von DEPC-H₂O zu einem Gesamtvolumen von 40 µl zusammengefügt. Die reverse Transkription der RNA erfolgte bei Raumtemperatur für 10 min und nachfolgend 42°C für 15 min.

Schließlich wurde die cDNA für 5 min auf 95 °C erhitzt, um verbleibende Enzyme zu inaktivieren.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.4.1 *Semiquantitative PCR*

Mit Hilfe der PCR erfolgt die enzymatische Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente *in vitro*. Dazu werden dem PCR-Reaktionsansatz zwei sequenzspezifische, entgegengesetzt gerichtete Oligonukleotide (Primer) im Überschuss hinzugesetzt. Durch thermische Denaturierung der DNA kann die DNA-Doppelhelix aufgetrennt werden. Nach Abkühlung des Reaktionsgemisches erfolgt die Anlagerung der Primer an den jeweils komplementären Strang (Annealing) und die Synthese des Komplementärstranges durch DNA-Polymerasen (Elongation). Die Wiederholung dieser Zyklen führt zur exponentiellen Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenz.

Die Menge der cDNA und damit die Expression der Messenger RNA (mRNA) wurde mit Hilfe der in Tabelle 2 aufgelisteten Primer ermittelt. Die Primer wurden mittels der Internet-basierten Software Primer3 entworfen und ihre Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Spezies mittels der NCBI Blast Datenbank überprüft. Reagenzien zum Nachweis ribosomaler 18S rRNA (Classic II 18 S Internal Standards, Ambion) mit einer Endprodukt-Größe von 324 bp wurden als endogene Kontrolle zur Überprüfung der cDNA-Konzentration verwendet. Die spezifischen PCRs wurden in thermophilem DNA Poly 10x Buffer (Promega), welcher 500 mM KCL, 100 mM Tris-HCl (pH 9,0) und 1,0% Triton X-100 enthält, durchgeführt zusammen mit 2 mM MgCl₂, jeweils 10 mM der 4 Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), jeweils 30 µM der antiparallelen Primer sowie 0,25 U thermostabiler Taq DNA-Polymerase (Promega). Zu jeweils 1 µl der cDNA-Matrize (ca. 50 ng) wurden 9 µl des PCR-Reaktionsgemisches zugesetzt. Die Amplifizierung der Proben erfolgte durch initiale Denaturierung bei 94 °C für 5 min, gefolgt von 30 Zyklen von 94 °C (30 s), 60 °C (30 s) und 72 °C (30 s), sowie einem Elongationsschritt von 72 °C für 7 min. Die Kontrolle der Amplifikate erfolgte mittels Gelelektrophorese.

2.2.4.2 Gelelektrophorese

Die spezifischen Amplifikationsprodukte der PCR wurden entsprechend ihrer Größe mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Dabei wandern die negativ geladenen cDNA-Fragmente im elektrischen Feld in unterschiedlicher Geschwindigkeit Richtung Anode. Der Fluoreszenzfarbstoff *Vistra Green* (Amersham Biosciences) in der Gelmatrix interkaliert mit der Doppelhelix der DNA und erzeugt eine sichtbare Fluoreszenz im grünen Bereich (520 nm).

Die Amplifikationsprodukte wurden auf 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Hierzu wurde pro Gel 0,6 g Agarose eingewogen, mit 40 ml TBE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgekocht. Der Lösung wurden 4 µl *Vistra Green* zugesetzt und diese in eine Gelkammer mit eingesetzten Probenkämme gegossen. Nach Polymerisation der Gelmatrix wurden die Probenkämme entfernt und die Elektrophoreseapparatur mit TBE-Puffer aufgefüllt. Die PCR-Amplifikationsprodukte wurden mit jeweils 2 µl Probenpuffer (*Ficoll-Puffer*) versetzt und 10 µl dieses Gemisches neben der *HyperLadder I* (Bioline) als Molekulargewichtsstandard in die Geltaschen überführt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der cDNA bei einer konstanten Spannung von 80 V für ca. 1 h wurden die Agarosegele mit einem *Typhoon 8600 Variable Mode Imager* (Amersham Biosciences) bei 532 nm gescannt. Der Vergleich der Laufstrecken der Amplifikationsprodukte mit den Längenstandards ließ eine annähernde Bestimmung der Größe der cDNA-Fragmente zu. Die relative Expression der Zielgene wurde durch Berechnung des Zielgen/18S Quotienten ermittelt. Dazu wurden die spezifischen Banden mit Hilfe der Software *Image Master TotalLab Version 1.11* (Amersham Pharmacia Biotech) densitometrisch vermessen.

2.2.4.3 Realtime-PCR

Die RNA wurde wie oben beschrieben extrahiert. Der Expressionsgrad der ENaC-Untereinheiten wurde quantitativ durch *TaqMan[®] Realtime-PCR* mit Hilfe eines *iCycler iQ* (Bio-Rad) untersucht. Bei der *TaqMan[®] Realtime-PCR* gibt ein Donor-Fluorochrom (Reporter), das durch eine Lichtquelle angeregt wird, einen Teil seiner Energie an ein in der Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) ab. Dabei wird eine *TaqMan[®]-Sonde* (Probe) genutzt, die an ihrem einen Ende den Quencher-, am anderen den Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (hier FAM oder VIC) trägt. Die *Taq-Polymerase* besitzt neben ihrer Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonukleasefunktion

und baut die Sonde während der Synthese des Gegenstranges an ihrem 5'-Ende ab. Dadurch nimmt die Entfernung zwischen Quencher und Reporter zu. Während bei intakten TaqMan[®]-Sonden die Fluoreszenz des Reporters durch den Quencher mittels strahlungsfreier Energieübertragung unterdrückt wird, kann durch Abbau des Quenchers nun eine erhöhte Fluoreszenz des Reporters detektiert werden. Eine Messung des Lichtsignals findet im Anschluss an den Elongationsschritt in jedem Zyklus statt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der synthetisierten DNA zu.

Die einzelnen Reaktionen wurden in einem Reaktionsansatz von insgesamt jeweils 25 µl auf 96-Well Platten durchgeführt, wobei sich der Ansatz aus TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (3 mM Mn[Oac]₂, 200 µM dNTPs, 1,25 U AmpliTaq Gold Polymerase, 1,25 U AmpErase UNG; Applied Biosystems) und jeweils 1 µl (ca. 50 ng) cDNA-Matrize zusammensetzte. Alle Reaktionen erfolgten im Singleplex-Verfahren (Untersuchung nur eines Zielgens pro Well). 18S rRNA diente als endogene Kontrolle und ermöglichte, Expressionsdaten im Verhältnis zu einer internen Referenz darzustellen und individuelle Abweichungen der cDNA-Konzentration aufgrund unterschiedlicher Effizienz der reversen Transkription auszugleichen. Primer und Sonde für 18S (Applied Biosystems) wurden als präoptimierte Kontrolle erworben. Primer und Sonde zur Analyse der Zielgene, d.h. der ENaC-Untereinheiten, des AR und Erythropoetins (EPO) der Spezies Ratte und Maus, wurden als vorgefertigte "Assays on Demand" (Applied Biosystems) erworben. Die Sonde für die Zielgene wurde mit FAM, die Sonde für die endogene Kontrolle mit VIC markiert. Die Realtime-Messungen wurden für jede Sonde in Triplikaten (Duplikate in *in vitro* Studien) in mindestens 2 PCR-Durchläufen durchgeführt. Amplifizierung der cDNA erfolgte bei 50°C (2 min), 95°C (10 min) sowie 44 Zyklen von 95° (15 s) und 60°C (1 min). Entsprechend der Hersteller-Hinweise wurden die gemessenen Daten als "Threshold cycle" (Ct) dargestellt (Zahl des Zyklus, bei dem der logarithmische PCR Plot einen festgelegten Schwellenwert übersteigt). Threshold cycles unterschiedlicher PCR-Durchläufe des gleichen Zielgens wurden einander anhand einer Standardkurve (1:1 – 1:1000) angepasst. Ct-Werte wurden zur Berechnung von dCt-Werten genutzt (Differenz Expression der endogenen Kontrolle – Expression des Zielgens). Der Expressionsgrad eines Zielgens wurde als

Vielfaches der Expression wie folgt berechnet: $\text{Expressionsgrad} = 2^{\text{Differenz der Mittelwerte von dCt der verglichenen Gruppen}}$

2.2.5 Isolierung von Protein

Die weiblichen Ratten betreffend wurde Protein aus Gesamt-Nierengewebe mittels einer Gesamt-Proteinextraktions-Methode isoliert. Die Proben (ca. 30 mg Gewebe eines Nierenquerschnitts) wurden in je 1 ml RIPA-Puffer, bestehend aus 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Igepal 40, 0,5% Natrium-Desoxycholat, 0,1% SDS und Protease-Inhibitor (Complete Mini, Roche, 1 Tablette auf 10 ml Pufferlösung), homogenisiert. Zur Denaturierung von DNA wurde das Homogenisat für 1 min auf 95°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Nach Sonifizierung der Proben mit Hilfe des Ultraschall-Homogenisators Labsonic M (B. Braun Biotech International) wurden die Proben bei 10000 rpm für 10 min bei Zimmertemperatur in einer Zentrifuge 5415C (Eppendorf) zentrifugiert und der das Protein beinhaltende Überstand zur weiteren Analyse genutzt.

Die männlichen Ratten betreffend wurde das Protein aus dem Gesamt-Nierengewebe mit Hilfe des ReadyPrep™ Protein Extraction Kits (Bio-Rad) gemäß Herstelleranweisungen isoliert. Dazu wurde das Gewebe in jeweils 1 ml Mastermix aufgenommen, welcher sich aus 10 µl ReadyPrep™ TBP-Reduktions-Agens und 10 µl Bio-Lyte® 3/10 Ampholyte Buffer (Bio-Rad) auf 1 ml ReadyPrep™ 2-D Rehydratations/Sample-Puffer 1 sowie Protease-Inhibitor (Complete Mini, Roche) zusammensetzte. Das Gemisch wurde für 90 – 120 s sonifiziert und bei 16000 rpm sowie 18°C für 25 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt das Protein und wurde zur weiteren Analyse verwendet.

Protein aus Zellkulturexperimenten wurde ebenfalls mittels RIPA-Puffer extrahiert. Dazu wurden die Zellen mit vorgekühltem PBS gewaschen und anschließend kurz mit 300 µl RIPA-Puffer pro 25 cm²-Kulturflasche inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Cell Scraper (Costar, Corning Inc.) vom Boden gelöst und mit einer sterilen Pipette in ein Eppendorf-Gefäß übernommen. Im Folgenden wurden die Zellen für 5 min bei –80°C eingefroren und anschließend für 30 min auf Eis aufgetaut. Nach Zentrifugieren der Zellsuspension für 10 min bei 4°C und 14000 rpm wurde der Überstand mit dem isolierten Gesamt-Proteingemisch in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Die Konzentration des Gesamt-Proteins wurde mittels eines modifizierten Lowry-Assays (DCTM Protein-Assay, Bio-Rad) bestimmt. Albumin aus Rinderserum (Protein Standard II, Bio-Rad) wurde in definierten Konzentrationen von 0,25 – 1,5 mg/ml zur Ermittlung einer Standardkurve genutzt. 5 µl jedes Standards bzw. jeder Probe wurden 25 µl Natriumhydroxid mit 2% Natrium-Dodecylsulfat (Reagenz A und S), 200 µl Folin-Reagenz (Reagenz B) sowie 30 µl DEPC-H₂O zugesetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die spezifische Absorption bei 690 nm wurde in einem Genesys 10 UV/Vis Spektrophotometer (Thermospectronic) bestimmt.

2.2.6 Western Immunoblot

2.2.6.1 Western Blot

Die Auftrennung des Gesamt-Proteingemisches erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE bzw. Western Blot). Dabei werden die positiv und negativ geladenen Proteine abhängig von ihrer Molekülgröße im elektrischen Feld aufgetrennt. Vor den einzelnen Versuchen wurden die Polyacrylamidgele gegossen. Nach Herstellung des 10%igen Trenngels, welches sich aus 3,33 ml 30% Acrylamid/Bis-Lösung 29:1 (Bio-Rad), 1,25 ml 3 M Tris (pH 8,8), 0,1 ml 10% SDS, 0,5 ml 1,5% Ammoniumpersulfat, 4,82 ml mit einer Millipore-Ionenaustauscheranlage gewonnenem H₂O und 0,01 ml TEMED zusammensetzte, polymerisierte dieses für ca. 40 min. Im Folgenden wurde es mit dem 3,75%igen Sammelgel überschichtet, welches aus 1,25 ml 30% Acrylamid/Bis Lösung 29:1 (Bio-Rad), 2,5 ml 0,5 M Tris (pH 6,8), 0,1 10% SDS, 0,5 ml 1,5% Ammoniumpersulfat, 5,65 ml Millipore-gefiltertem H₂O und 0,01 ml TEMED bestand. Die Zeit zur erneuten Polymerisierung betrug ca. 40 min. Vor dem Füllen der Geltaschen wurde der Proteingehalt der einzelnen Proben hinsichtlich der spektrophotometrischen Messungen so angepasst, dass schließlich 30 µg Gesamt-Protein jeder Probe miteinander verglichen werden konnten. Das Protein wurde entsprechend mit DEPC-H₂O verdünnt und schließlich 1:1 mit einem 2x Probenpuffer versetzt, dem beta-Mercaptoethanol zugefügt worden war, um Schwefelbrückenbindungen im Protein aufzubrechen. Die Proben wurden für 5 min auf 95°C erhitzt, um die Proteine vollständig zu denaturieren. Es wurden maximal 25 µl der Proben in die Geltaschen gefüllt, als Längenstandard wurde pro Gel 5 µl Precision Plus ProteinTM Standard

(Bio-Rad) genutzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS-PAGE-Laufpuffer für 15 min bei 50 V und anschließend ca. 3,3 h bei einer Spannung von 110 V.

Die Qualität des Gesamt-Proteingemisches wurde durch Auftrennung mittels SDS-PAGE und anschließender Färbung mit Coomassie-Blau überprüft. Dazu wurde wie eingangs beschrieben vorgegangen, jedoch 12,5%iges Trenngel genutzt und 10 µl des Gesamt-Proteingemisches pro Probe aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 110 V für ca. 1 h. Das Sammelgel wurde vom Trenngel befreit und bei 60°C für 15 min unter einem Abzug in der Färbelösung, bestehend aus 0,1 g Coomassie-Blau, 45 ml Methanol, 45 ml Essigsäure und 100 ml H₂O_{bidest}, inkubiert. Anschließend wurde das Gel zweimal in Entfärbelösung, bestehend aus 60 ml Methanol, 20 ml Essigsäure und 220 ml H₂O_{bidest} für 30 min bei 60°C gewaschen. Die Gele wurden dann mit dem Image Scanner (Amersham Pharmacia Biotech) gescannt und die Proteinqualität der einzelnen Proben bewertet.

2.2.6.2 Immunoblot

Unter Immunoblotting versteht man die elektrophoretische Übertragung der Proteine von einem Gel auf eine Membran und ihre anschließende Detektion mittels spezifischer Antikörper. In dieser Arbeit wurden die Proteine elektrophoretisch mittels Semi-Dry-Blotting auf Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL, Amersham Biosciences) übertragen. Die Nitrocellulose-Membran wurde vor der Elektrophorese mit H₂O_{bidest} angefeuchtet, für 5 min in Transfer-Puffer (Toubin-Puffer) inkubiert und zwischen zwei Schichten von ebenfalls in Transfer-Puffer getränktem Whatman GB005 Gel-Blotting-Papier (Schleicher & Schuell Microscience GmbH) im Blotting-System gebettet. Vor Auflegen des oberen Filters wurde das vom Sammelgel befreite und ebenso in Transfer-Puffer getränkte Gel auf der Membran positioniert. Das Sandwich aus Filtern, Membran und Gel wurde zwischen Anoden- und Kathodenplatte gespannt und die Proteine schließlich bei 0,2 A (für den Transfer zweier Gele) für 2 h auf die Nitrocellulose-Membran übertragen. Anschließend wurden die Proteine für 1 h mit 5% ECL Advance Blocking Reagenz (Amersham Biosciences) in 0,05%igem PBS-Tween inkubiert und so auf der Membran fixiert. Zum Nachweis von AR und alpha-ENaC wurden polyklonale Antikörper vom Kaninchen (AR: Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA; alpha-ENaC: Affinity BioReagents, Golden, CO, USA) 1:500 in 5% BSA verdünnt. Die polyklonalen

anti-beta-ENaC (L558) und anti-gamma-ENaC (L550) Antikörper vom Kaninchen wurden freundlicherweise von Prof. Carolyn A. Ecelbarger (Georgetown University, Washington, DC, USA) zur Verfügung gestellt und 1:1000 (beta-ENaC) bzw. 1:750 (gamma-ENaC) in 5% BSA verdünnt. Die Membranen wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und nach einer Serie von 3 Waschschritten in 0,1%igem PBS-Tween am nächsten Morgen mit dem sekundären, Horseradish-Peroxidase-konjugierten anti-Kaninchen Antikörper (Amersham Biosciences) in einer Verdünnung von 1:1000 (für beta-ENaC und AR), 1:3000 (für gamma-ENaC) oder 1:4000 (für alpha-ENaC) in 5% BSA für 1,5 h inkubiert. Nach einer weiteren Serie von Waschschritten wurden die Proteine schließlich mittels Peroxidase-katalysierter Chemilumineszenz (ECL, Amersham Biosciences) und Autoradiographie detektiert. Als Detektionssystem diente das ECL Western Blot Detection System (Amersham Biosciences). Die Herstellung des Detektionsreagenz erfolgte nach Herstellerangaben, die Membran wurde für 1 min im Detektionsreagenz inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde entfernt, die Membran mit einer durchsichtigen Folie abgedeckt und die Lichtemission im Film-Entwicklungsautomaten Kodak X-OMAT Multiloader 300 Plus (Kodak AG) detektiert und fotografiert.

Neutralisierendes AR-Blocking Peptid (Santa Cruz Biotechnology Inc.) und alpha-ENaC-Blocking Peptid (Affinity Bioreagents) wurde in den spezifischen Immunoblots initial mit dem primären Antikörper präinkubiert, um AR- und alpha-ENaC-spezifische Banden zu hemmen und die Spezifität des Immunoblots zu überprüfen (Abb. 6). Laut Hersteller-Richtlinien wurde erwartet, dass der anti-AR Antikörper das spezifische Rattenprotein bei einer Größe von etwa 120 kDa bindet. Der anti-alpha-ENaC Antikörper sollte das unglycosylierte Rattenprotein bei ungefähr 75 kDa binden. Dies konnte in unseren Immunoblots bestätigt werden. Anti-beta-ENaC und anti-gamma-ENaC Antikörper wurden bereits charakterisiert [140] und sollten spezifische Banden bei 90 kDa bzw. 85 kDa bilden. Für die ENaC Western Blots wurden 30 µg Protein aus Rattenleber als Negativkontrolle, für die AR Western-Blots 15 µg Protein aus HKC-8 Zelllysaten, die vorher mit Testosteron behandelt worden waren, als Positivkontrolle genutzt. Da die Western Blots lediglich repräsentative Bilder darstellen, erfolgte keine densitometrische Auswertung.

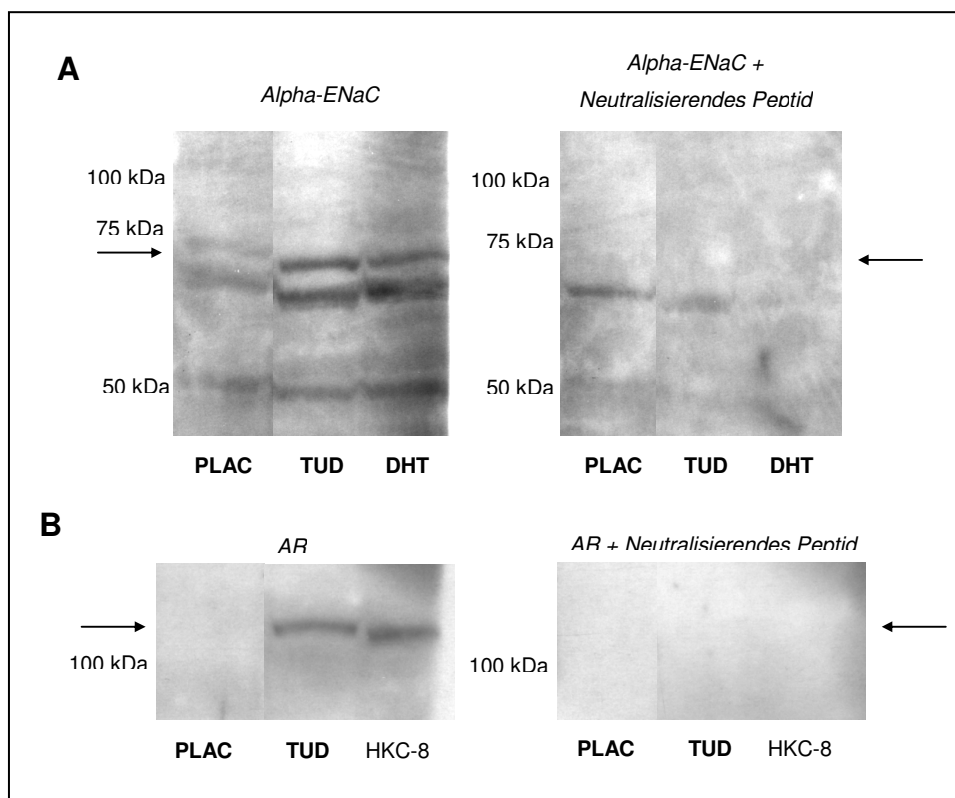


Abbildung 6: Detektion spezifischer Banden von renalem Protein von alpha-ENaC (A) und AR (B) im Western Blot. Protein von unbehandelten HKC-8-Zellen als Positivkontrolle. Spezifische Banden für alpha-ENaC und AR durch Präinkubation mit dem primären Antikörper und dem neutralisierenden Peptid detektiert. Alle Banden von demselben repräsentativen Immunoblot.

2.2.7 Statistische Auswertung

Die Daten aus Realtime-PCR wurden als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die statistische Analyse der Realtime-PCR-Daten erfolgte auf Grundlage der mittleren dCt-Werte (und nicht dem Vielfachen der Expressionsänderung), um potentielle Bias, die durch Rundung und Zusammenfassung bei der Transformation 2^{-Ct} auftreten könnten, auszuschließen. Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte in zutreffenden Fällen mittels eines ungepaarten T-Tests. Andernfalls wurde der einfaktorielle ANOVA-Test mit anschließendem Post-Hoc-Test nach Bonferroni genutzt. Als Software stand GraphPad Prism 4 Version 4.01 (San Diego, CA, USA) zur Verfügung. Ein P-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

2.2.8 Transkriptionsfaktorenanalyse der Promoterregion

Die Sequenzen der Gene von alpha- (SCNN1A), beta- (SCNN1B) und gamma-ENaC (SCNN1C) sowie AR für die Spezies Ratte und Maus wurden über die internationale Genbank des National Center for Biotechnology Information abgerufen. Eine Analyse der 2 kb umfassenden 5'-UTR stromaufwärts vom Transkriptionsstart des jeweiligen Gens erfolgte mit Hilfe des Transcription Element Search System (TESS). Die dort ermittelten Transkriptionsfaktoren sind potentielle Liganden, ihre Funktionalität ist damit jedoch nicht erwiesen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Tiere der in vivo Expressionsstudien

Sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Wistar-Ratten, die mit dem langwirkenden Ester Testosteron-Undecanoat (TUD) behandelt worden waren, waren Testosteron-Serumspiegel nach der Behandlung signifikant höher verglichen mit gonadektomierten Kontrolltieren, die Placebo erhalten hatten (Tabelle 10). Die Testosteron-Serumspiegel bei Weibchen, die mit TUD 500 mg/kg KG (TUD500) behandelt worden waren, waren höher als die der mit TUD 100 mg/kg KG (TUD100) behandelten weiblichen Wistar-Ratten. 17beta-Estradiol (17beta-E2)-Serumspiegel waren in den TUD-Gruppen im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht erhöht, was darauf hinweist, dass die Effekte, die in diesen Tieren beobachtet wurden, Androgen-abhängig sind. 17beta-E2-Serumspiegel waren in Weibchen, die mit Estradiol (E2) behandelt worden waren, im Vergleich zu ovariectomierten Kontrolltieren erhöht. Weibliche Ratten, die TUD oder 5alpha-Dihydrotestosteron (DHT) erhalten hatten, tendierten zu einem höheren relativen Nierengewicht, angegeben als Summe beider Nieren im Verhältnis zum Gesamtgewicht des Tieres. Die Nieren zeigten eine signifikante Hypertrophie bei den Männchen, die mit TUD500 ($P < 0,001$) oder DHT ($P < 0,01$) behandelt worden waren, im Vergleich zu solchen Tieren, die Placebo (PLAC) erhalten hatten.

Als weiterer Indikator der Androgen-Wirkung konnte in der Realtime-PCR eine Heraufregulation der Erythropoetin (EPO) mRNA-Expression bei TUD500-Männchen auf 391% ($P < 0,05$) und bei DHT-Männchen auf 143% (statistisch nicht signifikant) gezeigt werden.

Behandlungsgruppen		Hormon-Serumspiegel			Relatives Nierengewicht (Nierengewicht pro Körpergewicht) (%)
		T (ng/ml)	17beta-E2 (pg/ml)	DHT (pg/ml)	
weiblich	PLAC	<0.20	<5.0	n.b.	0.74 ± 0.04
	TUD100	1.96 ± 0.62	<5.0	n.b.	0.75 ± 0.09
	TUD500	11.48 ± 7.95	<5.0	n.b.	0.78 ± 0.10
	DHT	<0.20	n.b.	3920 ± 3391	0.78 ± 0.02
	E2	<0.20	198.5 ± 111.9	n.b.	0.83 ± 0.07
männlich	PLAC	<0.20	<5.0	n.b.	0.63 ± 0.02
	TUD500	7.80 ± 2.30	<5.0	n.b.	0.84 ± 0.04*
	DHT	0.4 ± 0.20	n.b.	6180 ± 3222	0.79 ± 0.06**

Tabelle 10: Bestimmung von Hormonspiegeln *in vivo* und relativem Nierengewicht in weiblichen und männlichen Wistar-Ratten. Relatives Nierengewicht: Gewicht beider Nieren im Verhältnis zum Gesamtkörpergewicht nach 14-tägiger Hormonbehandlung; n.b.: nicht bestimmt; *: P<0,001 vs. männliche Placebo-Kontrolltiere; **: P<0,01 vs. männliche Kontrolltiere.

3.2 Renale ENaC Expression

Die Untersuchung der gonadektomierten und anschließend mit Placebo behandelten Ratten zeigte in der Realtime-PCR, dass sich die Expression aller ENaC-Untereinheiten wie auch des AR zwischen den Geschlechtern im unstimulierten Zustand nicht unterscheidet (P>0,05).

In der semiquantitativen PCR zeigte sich eine höhere Expression renaler alpha-ENaC mRNA in männlichen Wistar-Ratten, die mit TUD500 behandelt worden waren, im Vergleich zu männlichen Kontrolltieren (Abb. 7). Diese Beobachtung konnte in der quantitativen Realtime-PCR mit einer moderaten Heraufregulation der alpha-ENaC mRNA Expression auf 127% (in % der Expression bei Kontrolltieren des gleichen Geschlechts) bestätigt werden (statistisch jedoch nicht signifikant) (Abb. 8A). Interessanterweise wurde die Expression von alpha-ENaC mRNA bei weiblichen Ratten durch Testosteron eher herunterreguliert (Abb. 8B) und war schließlich bei DHT-Behandlung mit einer Expression von 15% signifikant niedriger im Vergleich zu weiblichen Kontrolltieren (P<0,05). Eine Behandlung mit E2 bewirkte eine nicht-signifikante Abnahme der Expression aller ENaC-Untereinheiten bei weiblichen Wistar-Ratten (Abb. 8B, 10B, 12B).

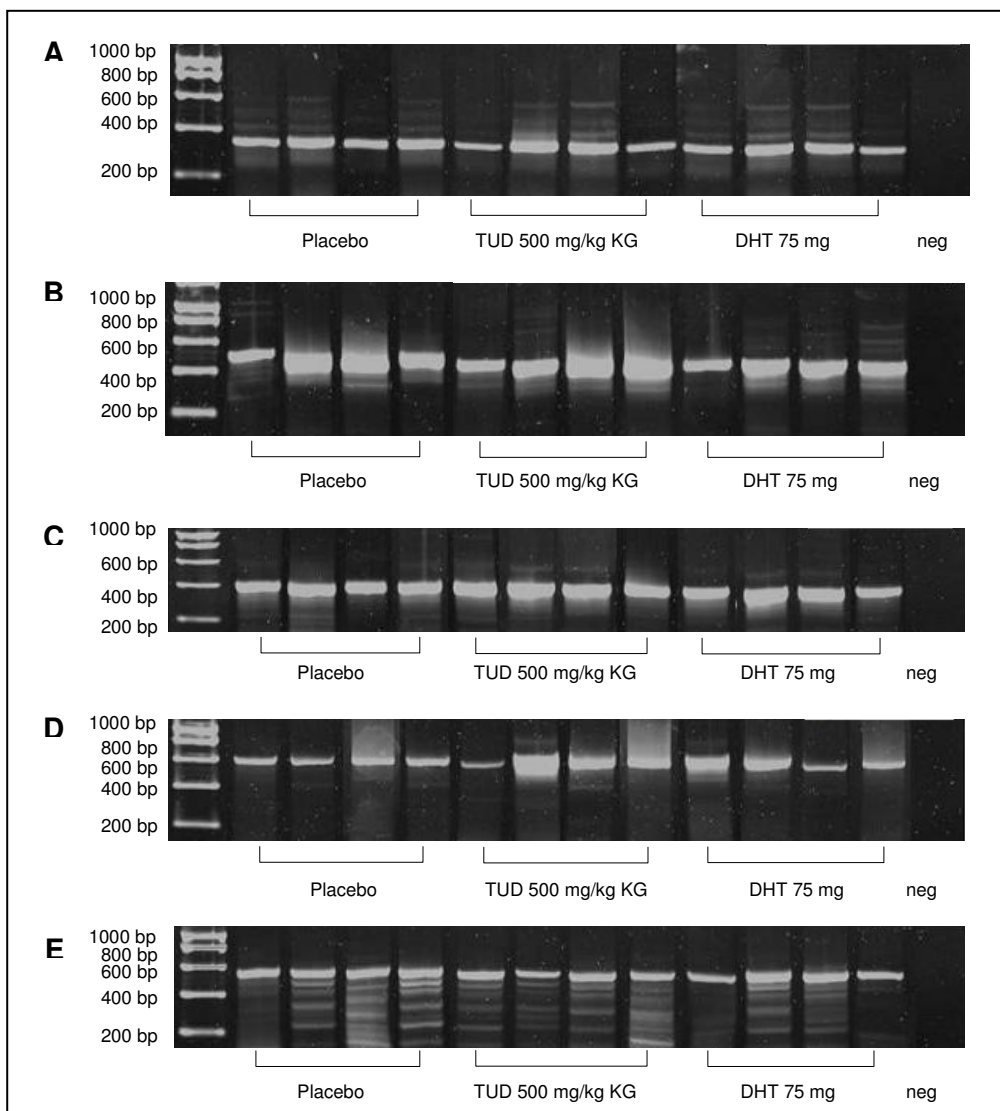


Abbildung 7: Semiquantitative PCR für ENaC-Untereinheiten und AR in orchietomierten männlichen Ratten. Expression von 18S rRNA als endogene Kontrolle (A). Relative Expressionen von renaler alpha-ENaC (B), beta-ENaC (C), gamma-ENaC (D) und AR mRNA (E) wurden standardisiert durch Berechnung des Zielgen/18S Quotienten. H₂O als Negativkontrolle.

Die Analyse der repräsentativen Western Blots bestätigte die Beobachtungen aus der Realtime-PCR. Bei männlichen Ratten war die renale alpha-ENaC Protein-Expression nach TUD500-Behandlung, aber auch nach Gabe von DHT höher im Vergleich zu den mit PLAC behandelten Kontrolltieren (Abb. 9A). Bei den weiblichen Wistar-Ratten hingegen war die alpha-ENaC Protein-Expression nach Testosteron- und E2-Gabe im Vergleich zu den weiblichen Kontrolltieren herunterreguliert (Abb. 9B). Renales alpha-ENaC Protein war kaum detektierbar in solchen Weibchen, die mit DHT behandelt worden waren.

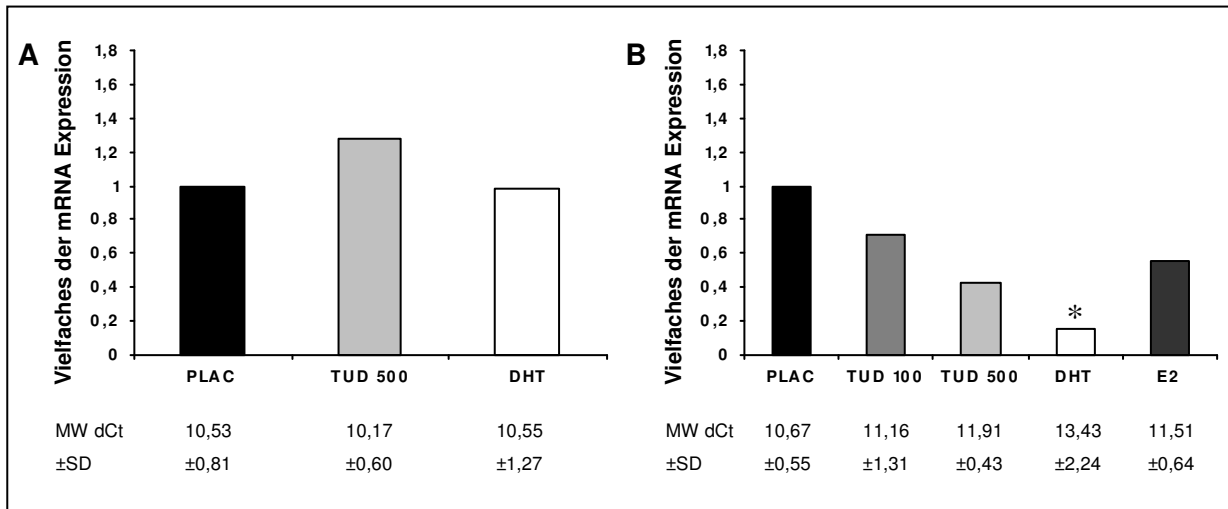


Abbildung 8: Vielfache Änderung der alpha-ENaC mRNA Expression bei gonadektomierten männlichen (A) und weiblichen (B) Ratten. Placebo-Kontrolltiere als Einfaches der Expression dargestellt. Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD). *: P<0,05 vs. Kontrolltiere.

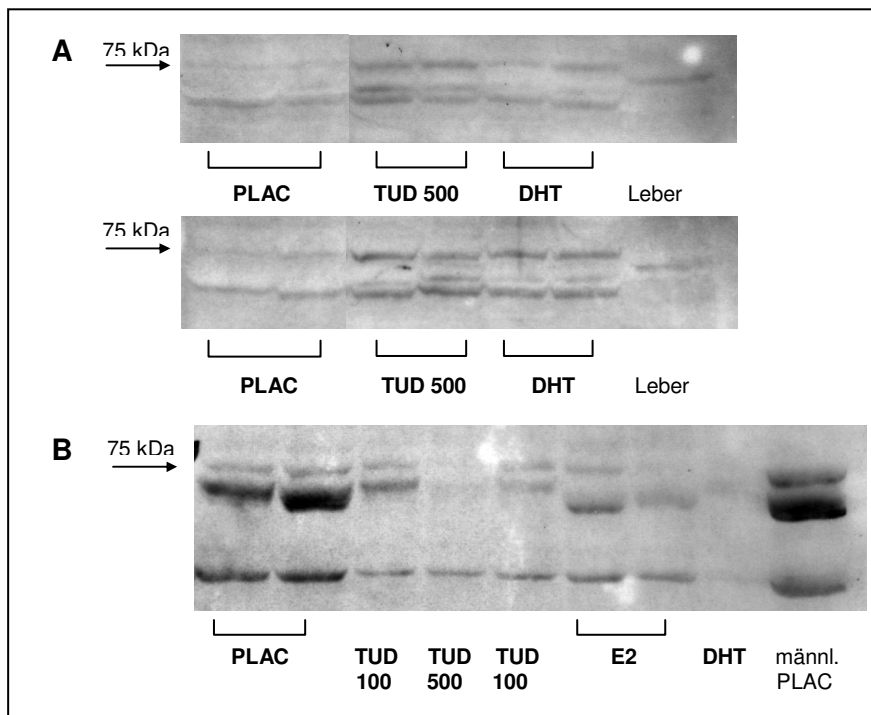


Abbildung 9: Repräsentative Western Blots von alpha-ENaC Protein in männlichen (A) und weiblichen (B) Ratten.

Hinsichtlich der renalen beta-ENaC mRNA Expression zeigten Männchen weder in der semiquantitativen noch in der quantitativen Realtime-PCR eine Androgen-abhängige Regulation (Abb. 10A). Bei weiblichen Ratten bewirkte TUD eine verminderte Expression von beta-ENaC mRNA im Vergleich zu weiblichen Kontrolltieren und DHT regulierte jene Untereinheit sogar signifikant auf 26% des ursprünglichen Expressionsniveaus herunter ($P < 0,05$) (Abb. 10B). Die Western Blots zeigten im Wesentlichen eine geringe Expression von beta-ENaC Protein in allen Gruppen. Während eine spezifische Regulation der renalen beta-ENaC Protein Expression bei den männlichen Tieren nicht gesehen werden konnte (Abb. 11A), zeigte sich in den repräsentativen Western Blots der Weibchen eine Androgen-abhängige Herunterregulierung des beta-ENaC Proteins (Abb. 11B).

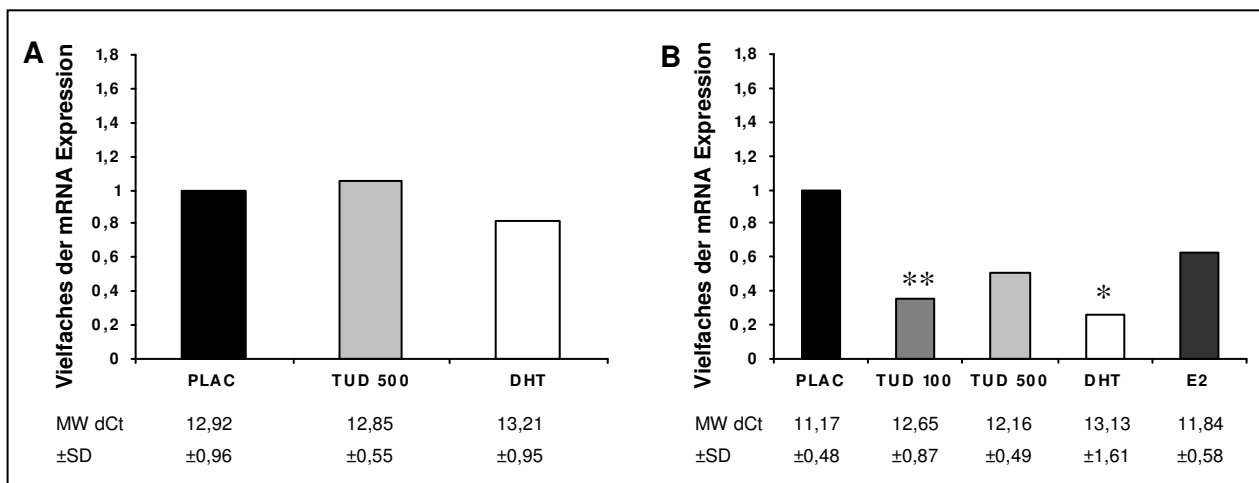


Abbildung 10: Vielfache Änderung der renalen beta-ENaC mRNA Expression in orchietomierten männlichen (A) und ovariektomierten weiblichen (B) Ratten. Placebo-Kontrolltiere als Einfaches der Expression dargestellt. Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD). *: $P < 0,05$ vs. Kontrolltiere; **: $P < 0,01$ vs. Kontrolltiere.

In ähnlicher Weise war eine Androgen-abhängige Regulation der gamma-ENaC mRNA Expression bei Männchen in semiquantitativer oder Realtime-PCR nicht zu sehen (Abb. 12A). Die Gabe von TUD500 und DHT bei Weibchen bewirkte jedoch eine Abnahme der gamma-ENaC mRNA Expression auf 50% bzw. 25% des Expressionsniveaus der weiblichen Kontrolltiere ($P < 0,05$) (Abb. 12B). Die Proteinexpression der renalen gamma-Untereinheit des ENaC war in allen Gruppen sehr gering. Eine Androgen-abhängige Regulation bei Weibchen oder Männchen konnte daher nicht detektiert werden.

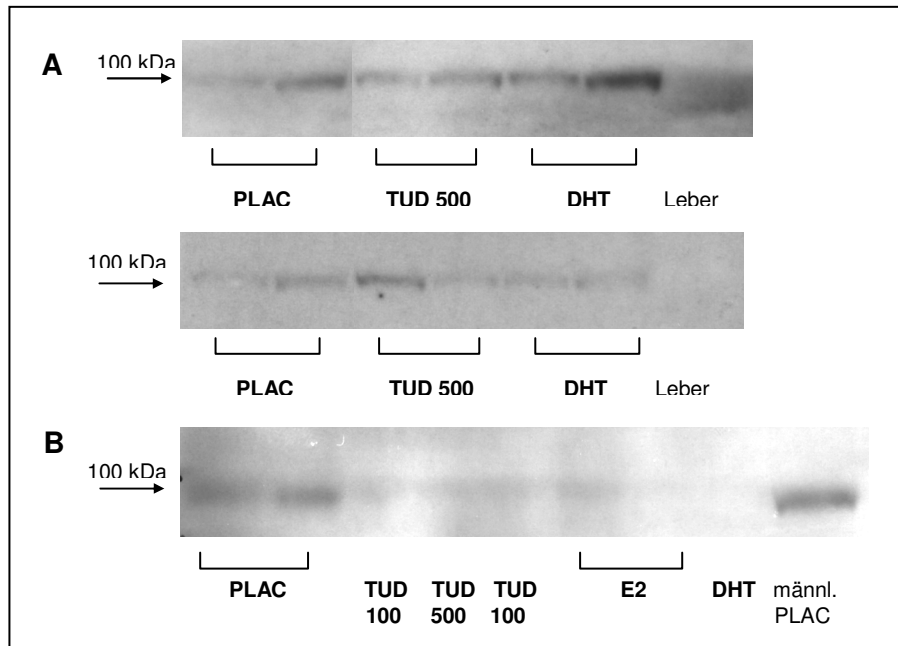


Abbildung 11: Repräsentative Western Blots von beta-ENaC Protein in männlichen (A) und weiblichen (B) Ratten.

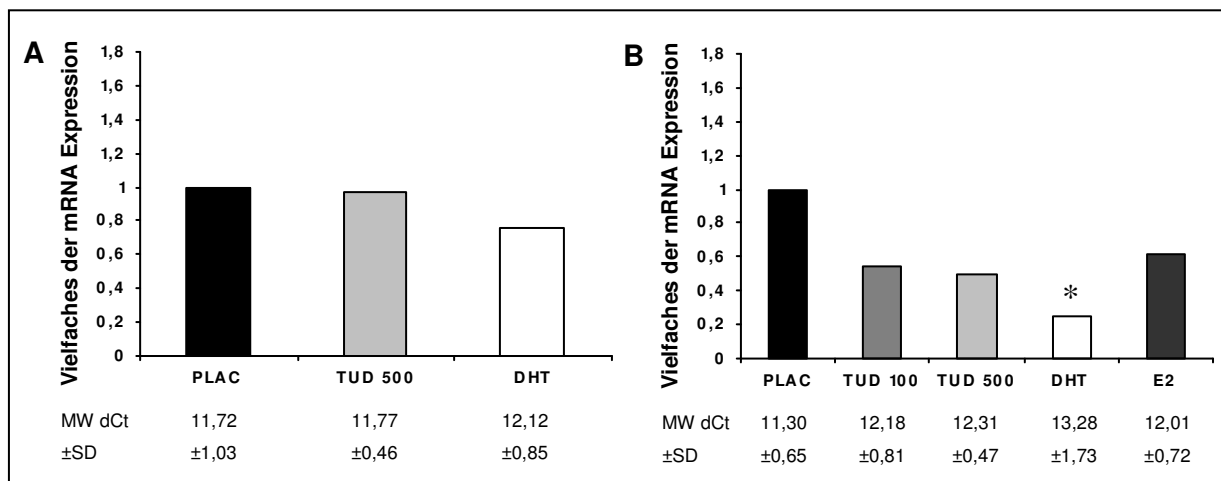


Abbildung 12: Vielfache Änderung der renalen gamma-ENaC mRNA Expression in orchiektomierten männlichen (A) und ovariectomierten weiblichen (B) Ratten. Placebo-Kontrolltiere als Einfaches der Expression dargestellt. Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD). *: $P < 0,05$ vs. Kontrolltiere.

3.3 Renale AR Expression

Die quantitative Realtime-PCR zeigte, dass AR mRNA in allen männlichen und weiblichen Nieren exprimiert wurde. Das Expressionsniveau unterschied sich dabei nicht signifikant zwischen gonadektomierten unstimulierten weiblichen und männlichen Kontrolltieren. Die Gabe von TUD500 erhöhte die AR mRNA Expression bei männlichen Wistar-Ratten auf 285% im Vergleich zu männlichen Kontrolltieren ($P < 0,05$) (Abb. 13A). Interessanterweise zeigte sich bei den weiblichen Tieren hingegen eine Tendenz zur Androgen-abhängigen Herunterregulation von AR mRNA (Abb. 13B). Diese war signifikant niedriger bei Ratten, die für 14 Tage mit E2 behandelt worden waren (39%), verglichen mit weiblichen Kontrolltieren ($P < 0,05$). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung war die Proteinexpression des AR bei Männchen, denen TUD500 verabreicht worden war, im Western Blot im Vergleich zu männlichen Kontrolltieren erhöht (Abb. 14). Des Weiteren war die Expression von AR Protein auch in den Tieren erhöht, die mit DHT behandelt worden waren. Bei den weiblichen Tieren konnte der AR im Western Blot hingegen nur sehr schwach oder kaum detektiert werden. Eine Regulation des AR Proteins durch Androgene bei weiblichen Wistar-Ratten konnte daher nicht beurteilt werden.

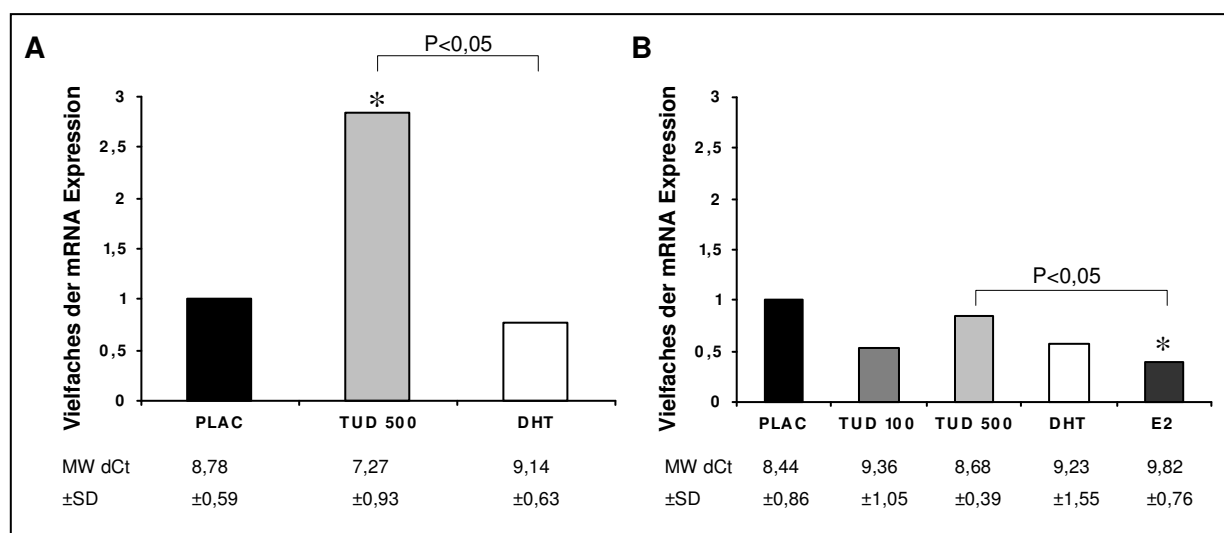


Abbildung 13: Vielfache Änderung der renalen AR mRNA Expression in orchiektomierten männlichen (A) und ovariectomierten weiblichen (B) Ratten. Placebo-Kontrolltiere als Einfaches der Expression dargestellt. Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD). *: $P < 0,05$ vs. Kontrolltiere.

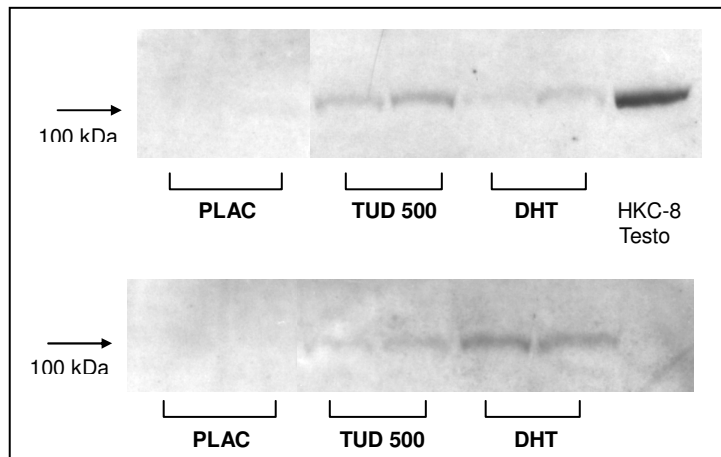


Abbildung 14: Repräsentative Western Blots von AR Protein in männlichen Ratten.

3.4 In Vitro Studien

3.4.1 Expressions- und Stimulationsstudien in M1-Zellen

Während die semiquantitative PCR eine Expression von AR mRNA in M1-Zellen bestätigte, schien die unstimulierte Expression von AR Protein im Western Blot fraglich. Auch nach Stimulation mit 10^{-6} M Testosteron konnte eine Expression von

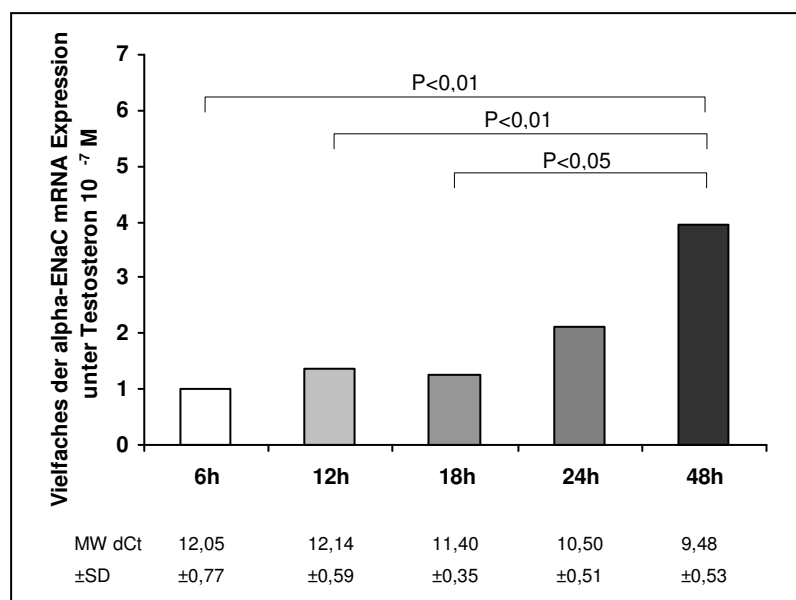


Abbildung 15: Vielfache Änderung der renalen alpha-ENaC mRNA Expression in M1-Zellen nach Stimulation mit Testosteron 10^{-7} M über mehrere Stunden. Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD).

AR Protein nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die ENaC-Untereinheiten zeigten unstimuliert ebenfalls eine sehr schwache Proteinexpression.

Die Inkubation der Zelllinie mit 10^{-7} M Testosteron für 6, 12, 18, 24 und 48 h zeigte zunächst eine signifikante Stimulation von alpha-ENaC mRNA nach 48 h (48 h vs. 6 h sowie vs. 12 h $P < 0,01$, 48 h vs. 18 h $P < 0,05$) (Abb. 15). Aus diesem Grund wurde für die folgenden Experimente ein Inkubationszeitraum von 48 h gewählt. Dennoch zeigte die Inkubation mit 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M und 10^{-6} M Testosteron im Vergleich zur Inkubation mit 0,1%igem Ethanol (Kontrolle) keine signifikante Regulation von alpha-ENaC mRNA. Ebenso hatte eine Inkubation mit 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M und 10^{-6} M DHT keine signifikante Auswirkung auf die Expression von alpha-ENaC mRNA. Inkubation der M1-Zellen mit 10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M und 10^{-8} M Aldosteron zeigte keine Regulation der einzelnen ENaC-Untereinheiten (Abb. 16).

3.4.2 Expressions- und Stimulationsstudien in RCCD2-Zellen

In Western Blots bestätigte sich, dass RCCD2-Zellen alle Untereinheiten des ENaC exprimieren, wenngleich die Expression von ENaC Protein zum Teil nur sehr schwach war. Besonders für beta- und gamma-ENaC mRNA zeigte sich auch in der Realtime-PCR eine ausgesprochen schwache Expression. AR mRNA wurde zwar in der Realtime-PCR detektiert, aber AR Protein konnte in Western Blots kaum identifiziert werden.

Inkubation der RCCD2-Zellen mit 1 nM Aldosteron für 48 h führte zu keinem Konzentrationsanstieg von alpha-ENaC mRNA, aber die Stimulation von alpha-ENaC mRNA war signifikant nach Inkubation mit 100 nM Aldosteron (Abb. 17). Die Stimulation von beta- und gamma-ENaC mRNA wurde aufgrund der schwachen Expression nicht näher untersucht. Nach Inkubation der Zellen mit 50 nM Testosteron und 50 nM DHT sowie dem AR-Antagonisten Flutamid (50 nM) zeigte sich keine Expressionsänderung von alpha-ENaC mRNA (Abb. 18). Ebenso die Inkubation mit Testosteron (1 nM, 10 nM, 100 nM), DHT (1 nM, 10 nM, 100 nM), Flutamid (10 μ M), Flutamid (10 μ M) mit Testosteron (100 nM), Flutamid (10 μ M) mit DHT (100 nM), dem Aromatase-Inhibitor Formestan (1 μ M), Formestan (1 μ M) mit Testosteron (100 nM) sowie E2 (100 pM, 1 nM, 10 nM) für 24 h ergab keine signifikante Regulierung der einzelnen ENaC-Untereinheiten.

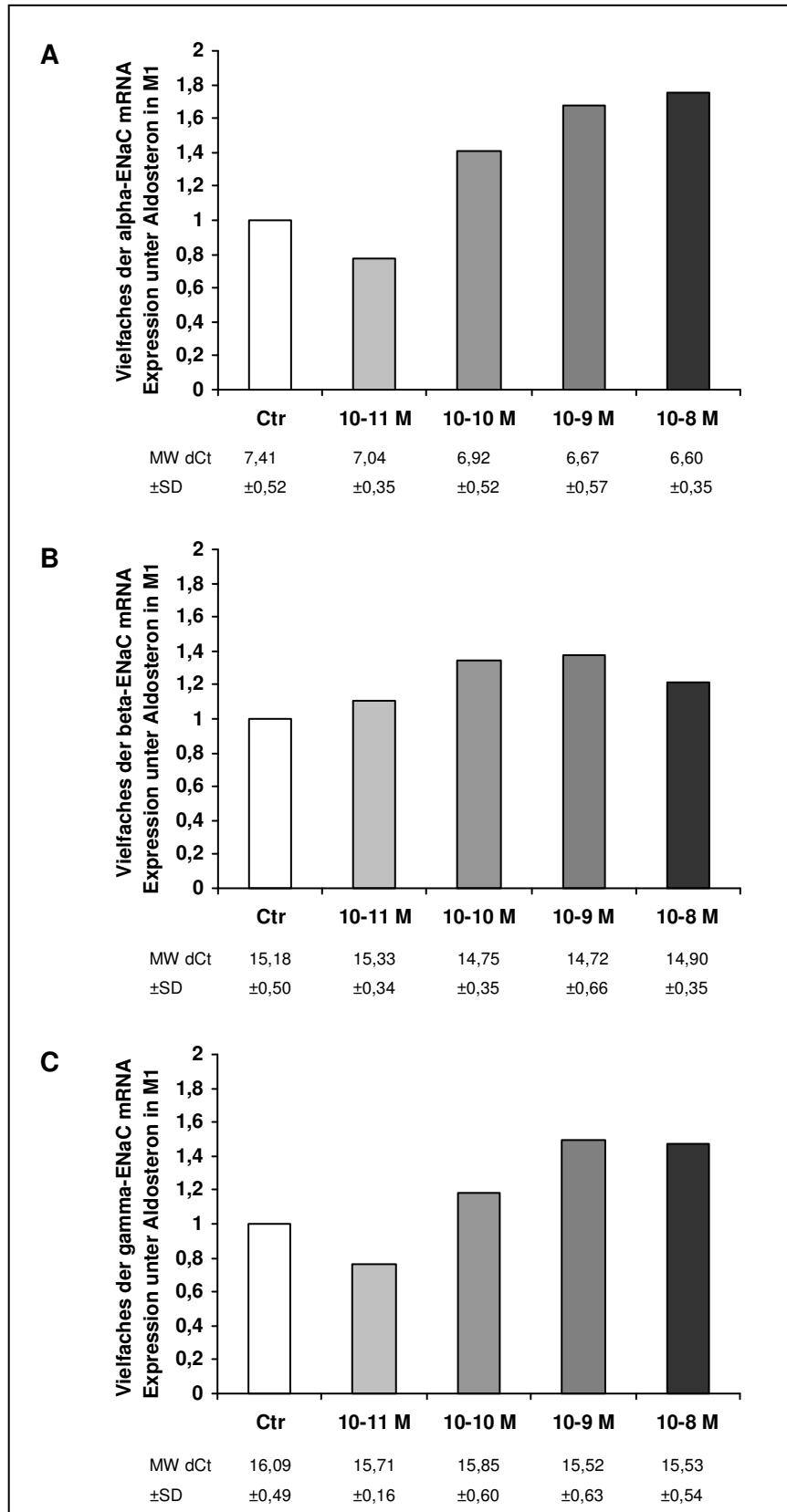


Abbildung 16: Vielfache Änderung der renalen mRNA Expression von alpha-ENaC (A), beta-ENaC (B) und gamma-ENaC (C) in M1-Zellen nach Stimulation mit Aldosteron 10^{-11} M bis 10^{-8} M über 48 h. Inkubation mit Ethanol als Kontrolle (Ctr) als Einfaches der Expression dargestellt. Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD).

Ergebnisse

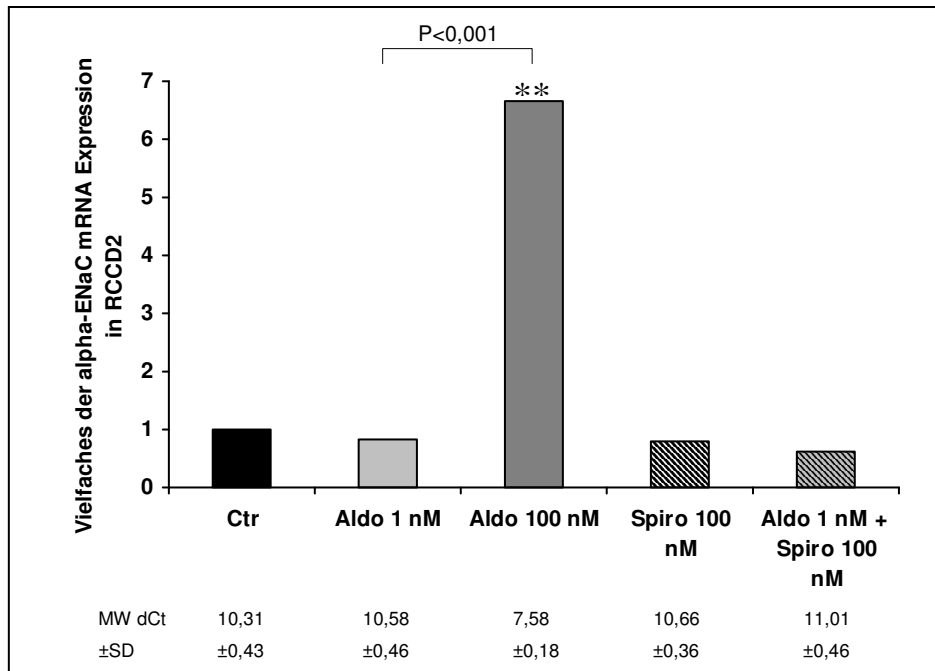


Abbildung 17: Vielfache Änderung der renalen alpha-ENaC mRNA Expression in RCCD2-Zellen nach Stimulation mit Aldosteron (Aldo) und Spironolacton (Spiro) über 48 h. Inkubation mit Ethanol als Kontrolle (Ctr) als Einfaches der Expression dargestellt. Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD).

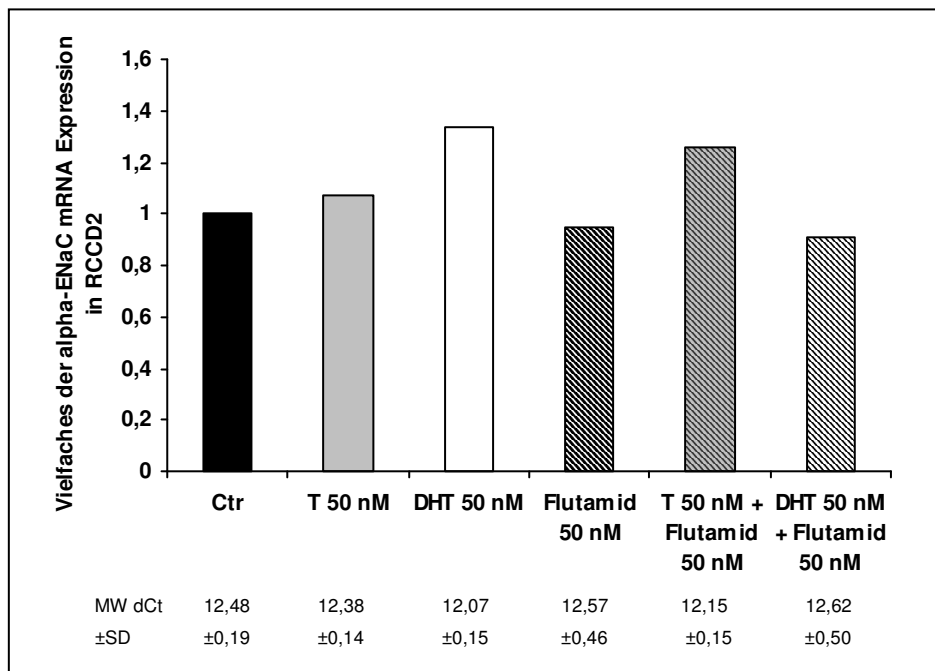


Abbildung 18: Vielfache Änderung der renalen alpha-ENaC mRNA Expression in RCCD2-Zellen nach Stimulation mit Testosteron (T) 50 nM, DHT 50 nM und Flutamid 50 nM über 24 h. Inkubation mit Ethanol als Kontrolle (Ctr) als Einfaches der Expression dargestellt. Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD).

3.4.3 Expressions- und Stimulationsstudien in VSMC-Zellen

Es ist bekannt, dass der AR auf Gefäßmuskelzellen exprimiert wird [141]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zunächst auf eine Expressionsanalyse der VSMC-Zellen verzichtet. Die unstimulierte Expression von alpha-ENaC mRNA war deutlich schwächer als in den untersuchten renalen Zelllinien, während die beta- und gamma-Untereinheit in VSMC-Zellen nicht exprimiert wird.

Nach Inkubation der Zellen mit 50 nM Testosteron und 50 nM DHT sowie zur Kontrolle mit dem AR-Antagonisten Flutamid (50 nM) für 24 h konnte keine Regulierung der alpha-Untereinheit durch Androgene in VSMC-Zellen beobachtet werden (Abb. 19). Ebenso ergab die Inkubation mit Testosteron (1 nM, 10 nM, 100 nM), DHT (1 nM, 10 nM, 100 nM), Flutamid (10 µM), Flutamid (10 µM) mit Testosteron (100 nM), Flutamid (10 µM) mit DHT (100 nM), dem Aromatase-Inhibitor Formestan (1 µM), Formestan (1µM) mit Testosteron (100 nM) sowie E2 (100 pM, 1 nM, 10 nM) für 24 h keine signifikante Regulierung der einzelnen ENaC-Untereinheiten.

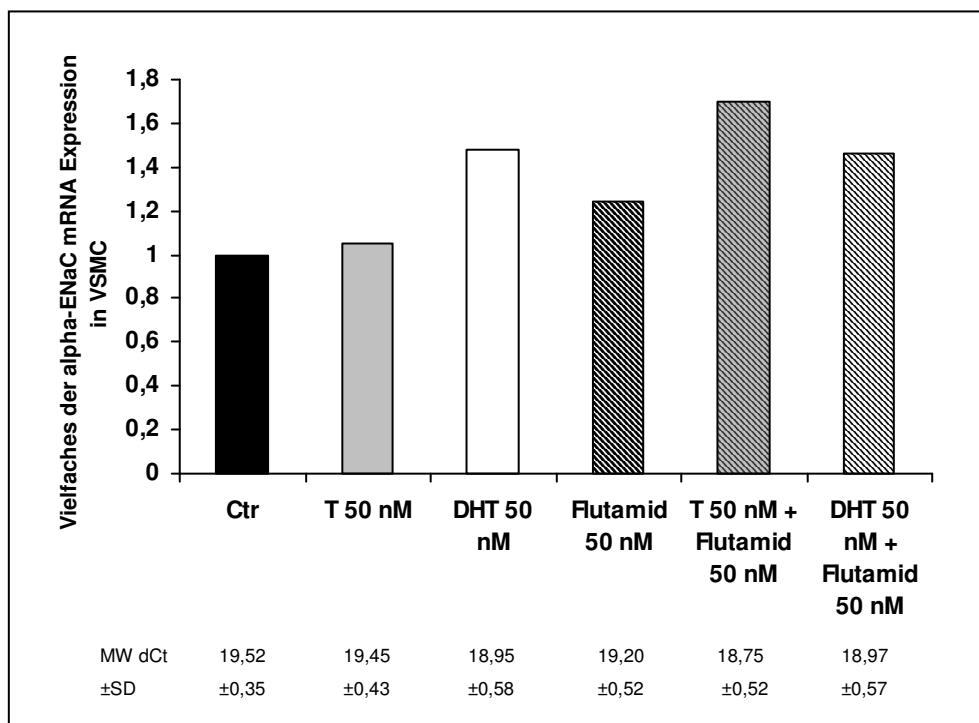


Abbildung 19: Vielfache Änderung der renalen alpha-ENaC mRNA Expression in VSMC-Zellen nach Stimulation mit Testosteron (T) 50 nM, DHT 50 nM und Flutamid 50 nM über 24 h. Inkubation mit Ethanol als Kontrolle (Ctr) als Einfaches der Expression dargestellt. Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD).

3.5 Transkriptionsfaktorenanalyse der Promoter-Regionen

In entgegengesetzter Leserichtung vom Transkriptionsstart von Exon 1a des alpha-ENaC Gens der Ratte aus finden sich unter anderem Sp1-Bindungselemente, AP-1, AP-2-alpha und AP-4-Elemente, korrespondierende Sequenzen für GATA1 und NF1-alpha, sowie mehrere C/EBP alpha-Bindungselemente, GREs und ein Estrogen-responsives Element (ERE). An Nukleotid-Position 805-791 in 5'-Richtung vom Transkriptionsstart konnte ein Androgen-responsives Element identifiziert werden (AGAACA-GAA-TGTCCT) (Abb. 20). Die 5'-UTR des alpha-ENaC Gens der Maus zeigt ein ähnliches Muster potentieller Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Neben einer Vielzahl von GREs findet sich auch hier ein ARE, welches 807-794 Basen vom Transkriptionsstart des Exon 1 entfernt ist. In den Promotoren der Gene von beta- und gamma-ENaC sowohl der Ratte als auch der Maus konnten mehrere GREs, jedoch kein ARE identifiziert werden. Auch die 5'-UTR des AR-Gens der Ratte zeigte in der Sequenzanalyse keine Transkriptionsfaktoren-Bindungsstelle für den AR.

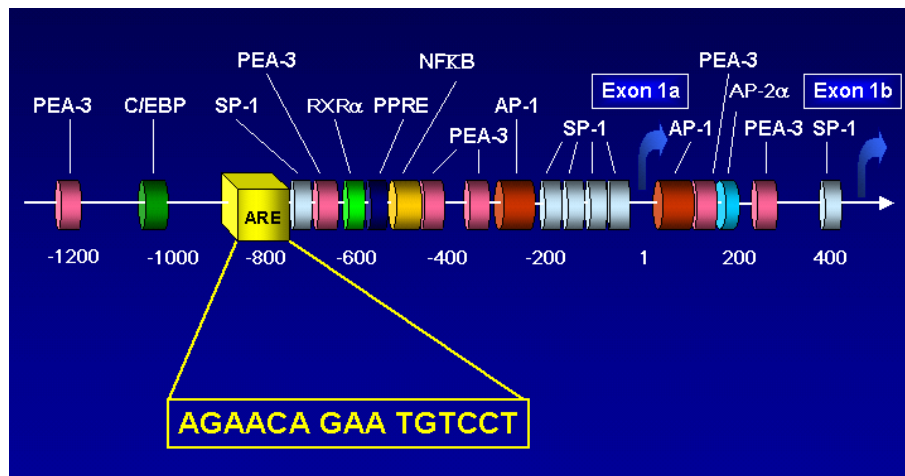


Abbildung 20: Repräsentative schematische Darstellung der 5'-UTR des alpha-ENaC-Gens der Ratte mit potentiellen Bindungsmotiven für ausgewählte Transkriptionsfaktoren. Blaue Pfeile zeigen den Transkriptionsstart für Exon 1 an (Exon 1a und Exon 1b). ARE: Androgen-responsives Element mit zugehöriger Basensequenz.

4 Diskussion

Mehrere Studien haben gezeigt, dass Estrogene insgesamt einen eher protektiven Effekt auf das kardiovaskuläre und renale System ausüben, während Testosteron eine arterielle Hypertonie eher zu fördern scheint. Die genauen Mechanismen dieser Regulation sind allerdings komplex und noch nicht vollständig verstanden.

4.1 Androgen-Wirkung im Rattenmodell *in vivo*

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Androgenen auf die Expression von AR und ENaC-Untereinheiten am Rattenmodell untersucht. Dabei ist wichtig, sich bewusst zu machen, dass lokal oder in anderen Organen Testosteron *in vivo* durch 5 α -Reduktase zum potenteren Androgen-Metaboliten 5 α -DHT aktiviert oder sogar durch die Aromatase in Estradiol umgewandelt werden kann (Abb. 21). Aus diesem Grund wurde der Serumspiegel von 17 β -Estradiol bestimmt, der in den mit TUD behandelten Gruppen nicht erhöht war. Dies deutet darauf hin, dass die Effekte, die in diesen Tieren beobachtet wurden, tatsächlich Androgen- und nicht Estrogen-abhängig sind. Nichtsdestotrotz ist zu bedenken, dass steroidogene Enzyme in der

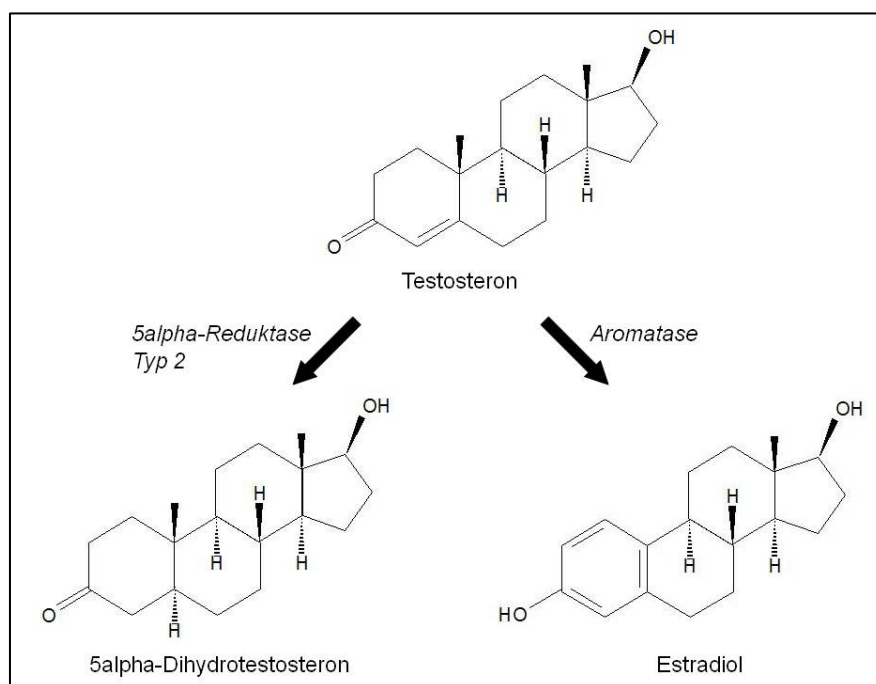


Abbildung 21: Metabolisierung von Testosteron.

menschlichen Niere exprimiert werden [142] und die Niere auf diese Art und Weise in der Lage wäre, Testosteron selbst zu synthetisieren und metabolisieren. Es gab jedoch keinen Hinweis auf eine intrarenale Umwandlung von Androgenen in Estrogene [142].

Als Bestätigung der androgenen Wirkung in diesem *in vivo* Rattenmodell war die Expression von EPO mRNA nach Androgen-Behandlung in männlichen Wistar-Ratten erhöht. Die stimulatorische Wirkung von Androgenen auf die Erythropoese [143] bzw. von Testosteron auf EPO ist seit langem bekannt [144, 145]. Dennoch waren in einer klinischen Testosteron-Dosis-Wirkungs-Studie beim Vergleich von Männern vom 19. – 35. Lebensjahr mit solchen vom 60. – 75. Lebensjahr die Testosteron-Spiegel nicht signifikant mit EPO-Serumspiegeln korreliert, obgleich Testosteron einen Anstieg von Hämatokrit und Hämoglobin bewirkt hatte [146]. Ebenso hatte der Androgen-Entzug im Rattenmodell durch Orchiektomie oder Injektion des AR-Antagonisten Flutamid keine Suppression von EPO mRNA-Spiegeln nach vier Wochen zur Folge [147]. Als weitere mögliche Wirkungsmechanismen von Androgenen auf die Erythropoese wurde eine verstärkte Sensitivität von erythrozytären Vorläuferzellen gegenüber EPO, eine längere Lebensdauer von Erythrozyten, ein direkter Effekt von EPO auf erythrozytäre Vorläuferzellen unterschiedlicher Reifegrade oder eine über IGF-1 vermittelte Stimulation postuliert [148]. Der genaue Mechanismus der Androgen-abhängigen Regulation von EPO ist noch immer nicht ganz klar, sollte aber nicht weiterer Gegenstand dieser Arbeit sein.

In dieser Arbeit waren die Nieren der mit TUD oder DHT behandelten Tiere im Verhältnis zu deren Gesamt-Körpergewicht vergrößert. Auch bei den weiblichen Wistar-Ratten konnte eine renale Hypertrophie nach Androgen-Behandlung gesehen werden, die allerdings nicht signifikant war. Studien an uninephrektomierten Ratten konnten zeigen, dass das Wachstum der einzelnen Niere sowie die glomeruläre Hypertrophie bei Männchen ausgeprägter ist als bei Weibchen [72]. Außerdem wurde beobachtet, dass bei uninephrektomierten Weibchen, die ovariektomiert und anschließend mit Geschlechtshormonen behandelt wurden, Nierenwachstum und glomeruläre Hypertrophie durch Testosteron gefördert werden.

4.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Grundexpression von ENaC und AR

Insgesamt gibt es wenige Daten darüber, ob sich die Grundexpression des ENaC zwischen beiden Geschlechtern *in vivo* unterscheidet. In dieser Arbeit unterschied sich die unstimulierte renale Expression der ENaC-Untereinheiten wie auch des AR zwischen den Geschlechtern nicht. In einer Studie von Riazi et al. war jedoch die Proteinexpression aller ENaC-Untereinheiten in den Nieren weiblicher Zucker-Ratten im Vergleich zu den Nieren der Männchen erhöht [149]. Allerdings waren diese Tiere zuvor nicht gonadektomiert worden. In einer anderen Studie von Gambling et al. zeigte sich im Northern Blot ebenfalls eine stärkere Expression von alpha-, beta- und gamma-ENaC mRNA in den Nieren weiblicher Wistar-Ratten im Vergleich zu denen männlicher Tiere [150]. Diese Differenz des Expressionsniveaus wurde jedoch nach Ovariectomie der Weibchen wieder aufgehoben. In den Lungen weiblicher, nicht-schwangerer, erwachsener Wistar-Ratten schienen alpha- und beta-ENaC im Vergleich zu Männchen oder schwangeren Weibchen ebenso stärker exprimiert zu werden [151]. Dabei zeigte sich, dass das quantitative Vorliegen der beiden ENaC-Untereinheiten in den Lungen durch die Phase des Estrogen/ Progesteron-Zyklus beeinflusst wird [151]. Andererseits schienen Geschlecht, Schwangerschaft oder Estrogen/ Progesteron-Zyklus keinen Einfluss auf die Expression von gamma-ENaC mRNA in der Lunge zu haben [151].

Auch für den AR sind geschlechtsspezifische Expressionsunterschiede beschrieben [135]. So soll AR mRNA in der Niere von männlichen Ratten ca. vierfach höher exprimiert sein als in weiblichen Ratten, was in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Die Zusammenschau aller Daten deutet aber darauf hin, dass eine Gonadektomie die Unterschiede in der Expression des ENaC zwischen beiden Geschlechtern ausgleichen könnte und der Kanal auf unterschiedliche Weise durch Geschlechtshormone reguliert wird.

4.3 Geschlechtsspezifische Regulation von ENaC

Wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist, dass der Einfluss von Androgenen auf den renalen ENaC geschlechtsspezifisch zu sein scheint. Eine Behandlung mit Androgenen bei männlichen Wistar-Ratten ergab einen Trend in Richtung

Heraufregulation der alpha-Untereinheit, der in dieser Arbeit allerdings nicht signifikant war. In vorherigen Untersuchungen durch Quinkler et al. konnte eine signifikante Expressionszunahme von alpha-ENaC nach Behandlung mit TUD 500 in männlichen Wistar-Ratten beobachtet werden [139]. Zudem zeigten Studien von Reckelhoff et al., dass durch Hemmung der Umwandlung von Testosteron in DHT mittels Gabe von Finasterid die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie in männlichen SHR nicht verhindert werden kann [30] und DHT somit keinen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung der Hypertonie zu haben scheint. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden und sind möglicherweise auf eine unterschiedliche methodische Vorgehensweise und unterschiedliche Dosierungen der Androgene zurückzuführen. Dennoch war auch in dieser Arbeit ein Trend in Richtung Expressionszunahme des alpha-ENaC nach Androgen-Stimulation bei männlichen Wistar-Ratten zu sehen ($P > 0,05$). Bei weiblichen Ratten bewirkten Androgene hingegen eine Abnahme der alpha-ENaC Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene. Der Einfluss von Androgenen war signifikant bei Behandlung mit DHT ($P < 0,05$). Androgene beeinflussten nicht die renale Expression der beta- oder gamma-Untereinheit des ENaC in männlichen Ratten. Mit Hilfe der quantitativen Realtime-PCR und des Western Blots konnte allerdings ähnlich wie für alpha-ENaC gezeigt werden, dass bei Weibchen beta- und gamma-ENaC durch Androgene herunterreguliert werden. Dieser Effekt war ebenfalls signifikant nach Behandlung mit DHT ($P < 0,05$).

4.3.1 Mögliche molekulare Funktionsmechanismen Androgen-abhängiger Wirkungen: Hormon-responsive Elemente

Hormon-responsive Elemente (HREs) arbeiten in den meisten Fällen unabhängig von ihrer Orientierung oder Position und vermitteln die Hormonwirkung auf einen benachbarten heterologen Promoter [152]. Sequenz-Analysen zeigten, dass HREs durch eine kurze, palindrome Konsensus-Sequenz charakterisiert werden können, die den jeweiligen Steroid-Rezeptor-Komplex bindet. Natürlich vorkommende HREs beinhalten oft die Sequenz TGTTCT und eine weitere hexamere Sequenz, die sich stark von dieser unterscheidet [153]. Dies trifft auch auf das Androgen-responsive Element (ARE) zu. Da die HREs einer Reihe von Steroiden sich in ihrer Sequenz

sehr ähnlich sind, wird deutlich, dass einzelne Gene oft einer Regulation durch mehrere Steroidhormone unterliegen [154].

Sowohl beim Menschen (Abb. 22) als auch bei der Ratte (Abb. 20) beinhaltet die 5'-UTR der alpha-Untereinheit des ENaC ein ARE, welches zu mehr als 90% Homologie mit dem GRE besitzt [155]. Wie auch das GRE [156] besteht das ARE aus einem palindromen Paar einer hexameren TGTYCT-Sequenz, welches durch drei Nukleotide voneinander getrennt wird. Promoter-Reporter-Studien in HKC-8-Zellen zeigten, dass das ARE für eine direkte Heraufregulation von alpha-ENaC mRNA durch Testosteron *in vitro* notwendig ist [139].

In der Promoter-Analyse der 5'-UTR der Gene von beta- und gamma-ENaC der Ratte konnte hingegen kein ARE gefunden werden [157, 158]. Dennoch fanden sich eine Vielzahl von hexameren Sequenzen, die als GRE wirken, und es ist nicht ausgeschlossen, dass der Androgen-AR-Komplex mit bestimmter Affinität an diese GREs bindet. Nichtsdestotrotz bleibt der genaue molekulare Mechanismus hinter der Androgen-abhängigen Regulation von beta- und gamma-ENaC bei weiblichen Ratten unklar. Ebenso sind weitere Studien nötig, um die geschlechtsspezifische Expression der ENaC-Untereinheiten detaillierter zu untersuchen. Interessanterweise war bei Männchen die Wirkung von DHT auf ENaC-Untereinheiten und Expression des AR

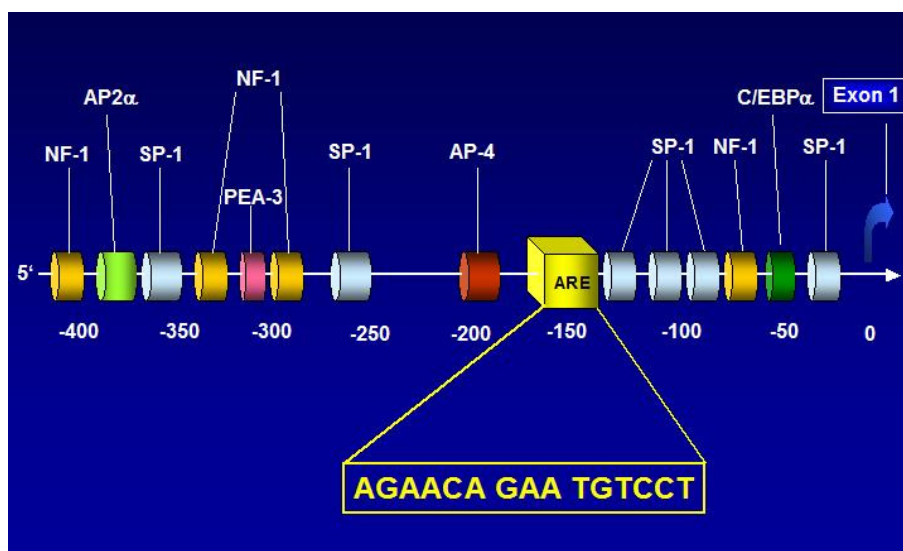


Abbildung 22: Repräsentative schematische Darstellung der 5'-UTR des alpha-ENaC-Gens des Menschen mit potentiellen Bindungsmotiven für ausgewählte Transkriptionsfaktoren (nach Quinkler et al. [139]). Der blaue Pfeil zeigt den Transkriptionsstart für Exon 1 an. ARE: Androgen-responsives Element mit zugehöriger Basensequenz.

nicht so stark wie die Wirkung von Testosteron. Bei Weibchen hingegen war der Effekt von DHT stärker als der von Testosteron. Ursache dessen könnte sein, dass in weiblichen im Vergleich zu männlichen Rattennieren der Testosteron-AR-ARE-Komplex bzw. der DHT-AR-ARE-Komplex möglicherweise unterschiedliche Co-Regulatoren oder Co-Suppressoren rekrutiert.

Die Promoter-Reporter-Studien in HKC-8-Zellen zeigten nicht nur, dass das ARE im Promoter des Gens für alpha-ENaC für dessen transkriptionelle Aktivierung verantwortlich ist, sondern auch, dass dieser Effekt durch Gabe des AR-Antagonisten Flutamid gehemmt werden kann [139]. Die Mutation des ARE hob den durch Testosteron vermittelten Effekt auf die Transkription des Gens für alpha-ENaC auf. Insofern ist davon auszugehen, dass die Heraufregulation von alpha-ENaC mRNA durch Androgene über AR und ARE vermittelt wird. In der Originalbeschreibung der Zelllinie HKC-8 durch Racusen et al. wurde leider nicht erläutert, ob die isolierten Zellen ursprünglich von einem männlichen oder einem weiblichen Patienten stammen [159]. Der Vergleich der AR-Proteinexpression in HKC-8-Zellen mit der in primären menschlichen Nierenzelllinien [139] weist jedoch darauf hin, dass HKC-8-Zellen wahrscheinlich von einem männlichen Spender stammen. Im Gegensatz zu Nierengewebe von männlichen Spendern und im Vergleich zu HKC-8-Zellen zeigt Nierengewebe von weiblichen Spendern eine schwache Expression von AR-Protein [139]. Dies könnte eine Erklärung dafür liefern, warum sich die Ergebnisse von Quinkler et al. aus HKC-8-Zellen von denen aus der Untersuchung weiblicher Wistar-Ratten unterscheiden. Zudem sollte bedacht werden, dass zur Untersuchung der Expression der ENaC-Untereinheiten in dieser Arbeit Gesamt-Protein der Niere genutzt wurde. Auf die Analyse spezifischer Abschnitte des Nephrons wurde verzichtet.

Interessanterweise konnte in menschlichen embryonalen 293T-Zellen der Niere gezeigt werden, dass Androgene ebenso Einfluss auf die Aktivität des MR haben [160]. Androgene sind selbst nicht in der Lage, den MR zu aktivieren, aber sie antagonisieren die durch Aldosteron bedingte Aktivierung des MR und hemmen den durch Aldosteron induzierten Natrium-Fluss in mpkCCD_{cl4}-Zellen (Sammelrohr-Zelllinie) [160]. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass die in dieser Studie beobachteten Effekte zum Teil durch Hemmung des MR vermittelt wurden. DHT ist

dabei ein potenterer MR-Antagonist als Testosteron. Androgene hatten im Übrigen keinen Einfluss auf die Aktivität des GR.

4.3.2 Einfluss von Estrogenen auf die Expression von ENaC

Der Estrogen-Rezeptor alpha (ER alpha) wird ebenfalls in den Nieren von Ratten exprimiert [161]. In dieser Arbeit hatte die Behandlung mit E2 für 14 Tage keinen signifikanten Einfluss auf die ENaC-Untereinheiten bei weiblichen Ratten, obgleich ein Trend in Richtung verminderter Expression gesehen werden konnte. Studien von Reckelhoff et al. zeigten ebenso, dass Ovariectomie und somit Verminderung des E2-Spiegels keinen Einfluss auf den Blutdruck in SHR hat [22]. Andere Studien demonstrierten jedoch in Northern Blots, dass ovariectomierte Ratten, die mit 17beta-Estradiolbenzoat behandelt wurden, einen Expressionsanstieg der renalen alpha-Untereinheit des ENaC nach 8 und 24 h aufwiesen, während beta- und gamma-ENaC mRNA nach 24-stündiger Behandlung nicht reguliert zu sein schienen [150]. Des Weiteren zeigte die kombinierte, aber nicht isolierte Gabe von 17beta-Estradiol und Progesteron eine Heraufregulation von alpha- und gamma-ENaC in der Lunge von Ratten nach 24 h [151]. Die Expression der beta-Untereinheit sank nach Behandlung mit 17beta-Estradiol oder Progesteron für 8 h in diesen ovariectomierten Ratten. Auch die Behandlung mit E2 über 12 Wochen in ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratten, welche einen durch Streptozotocin induzierten Diabetes mellitus entwickelt hatten, führte zu einer Herunterregulation der renalen beta-ENaC-Proteinexpression in Western Blots [162]. Allerdings ist zu bedenken, dass Streptozotocin als nephrotoxisch gilt und damit einen potentiellen Einfluss auf die Nierenfunktion besitzt. Die Diskrepanz all dieser Ergebnisse könnte Hinweis darauf sein, dass der in dieser Arbeit gesehene Effekt von E2 auf die ENaC-Expression durchaus gewebsspezifisch und abhängig von Behandlungsdauer, Vorbehandlung und Rattenart ist. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Promoter-Analyse der ENaC-Untereinheiten identifizierte mögliche EREs in der 5'-UTR jeder Untereinheit. Die Funktionalität dieser EREs wurde bislang jedoch noch nicht genauer untersucht.

4.3.3 Funktionalität des ENaC

Es ist bekannt, dass eine Verschiebung des relativen Verhältnisses von alpha-, beta- und gamma-ENaC mRNA in der Zelle in einer veränderten Zusammensetzung des epithelialen Natriumkanals mit anderen Charakteristika wie Ionenselektivität, Fluss und Amilorid-Sensitivität resultieren kann [163]. Die geschlechtsspezifischen Expressionsunterschiede, die in dieser Arbeit beschrieben werden, sind nicht groß, doch in der Summe könnten sie eine wichtige Rolle bezüglich der relativ kleinen Blutdruckunterschiede zwischen Männern und Frauen spielen. Da Testosteron auch über eine intrazelluläre Synthese in der menschlichen Niere selbst gebildet werden könnte [142], sind Androgen-Spiegel im Bereich des Nierenepithels möglicherweise höher, als Blutserumspiegel erwarten lassen. In Ratten, die sowohl kastriert als auch adrenaletomiert worden sind, kann Testosteron noch immer im Serum nachgewiesen werden [130]. Dies deutet auf eine extra-adrenale und -gonadale Androgen-Synthese hin. Elektrophysiologische Messungen in M1-Zellen zeigten, dass im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen eine Testosteron-Behandlung der Zellen zu einer signifikant erhöhten Antwort gegenüber Amilorid, einem ENaC-Inhibitor, führt [139]. Dies deutet wiederum daraufhin, dass Testosteron die ENaC-Aktivität stimulieren kann.

4.4 Autoregulation des AR

Die Autoregulation des AR durch Androgene ist gewebsspezifisch und altersabhängig [133-135], jedoch wurden Geschlechtsunterschiede in der Androgen-vermittelten Regulation des AR in der Rattenniere bislang nicht beschrieben. Immunohistochemische Experimente zeigten eine Expression des AR im distalen Tubulus der menschlichen Niere [127, 161] wie auch im renalen Sammelrohr der Ratte [130] und im Glomerulum [128]. In diesem *in vivo* Rattenmodell konnte eine renale AR mRNA Expression in allen Gruppen gefunden werden. Die Testosteron-Behandlung erhöhte die renale Expression von AR mRNA in männlichen Wistar-Ratten. Während DHT keinen Effekt auf den AR auf mRNA-Ebene hatte, erhöhte er dessen Protein-Expression. Dies weist darauf hin, dass die Autoregulation des AR durch DHT in der Rattenniere auf posttranskriptionaler Ebene stattfindet, z.B. durch erhöhte AR-Stabilität durch die Ligandenbindung. Eine Autoregulation des AR konnte allerdings nicht bei weiblichen Wistar-Ratten gesehen werden, bei denen eine

14-tägige Behandlung mit Androgenen die AR mRNA eher herunterzuregulieren schien. Eine AR-Proteinexpression war bei besagten Weibchen kaum detektierbar. Unter Nutzung der Northern Blot-Technik beschrieben andere Autoren einen Anstieg renaler AR mRNA in Rattennieren 4 Tage nach Orchiektomie der Ratten sowie einen Abfall der AR mRNA nach erneuter Stimulierung mit Testosteronpropionat für 24 h [136]. Die Diskrepanz im Hinblick auf die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse ist möglicherweise auf unterschiedliche Behandlungszeiträume zurückzuführen. Die 5'-UTR des menschlichen Gens [164, 165] wie auch des Ratten-Gens für den AR [166] beinhaltet kein ARE, aber in der kodierenden Region des menschlichen AR-Gens konnten zwei AREs identifiziert werden, die mit der Heraufregulation von AR mRNA in der menschlichen Prostatakarzinom-Zelllinie PC3 in Zusammenhang stehen könnten [132]. Ebenso ist es denkbar, dass der DHT-AR-Komplex über ein autokrines Feedback non-genomische Transduktionswege wie den MAPK-Signalweg aktiviert, so zur Phosphorylierung von AR und von AR-Co-Regulatoren führt und damit die transkriptionelle Aktivität des AR verstärkt [167]. Die Gewebsspezifität und geschlechtsabhängigen Unterschiede in der Autoregulation des AR weisen jedoch darauf hin, dass andere Faktoren als allein der AR bzw. Unterschiede in der posttranslationalen Modifikation des AR eine Rolle zu spielen scheinen. Des Weiteren ist bekannt, dass die transkriptionelle Aktivität des AR zum Teil von CAG-kodierten Polyglutamin-Sequenzen innerhalb des AR abhängig ist [168]. Eine Korrelation zwischen der Länge der CAG-Sequenzen und dem Blutdruck älterer Männer konnte jedoch nicht festgestellt werden. Eine mögliche Assoziation zwischen der Länge der CAG-Sequenzen innerhalb des AR und den geschlechtsabhängigen Blutdruckunterschieden wurde bislang nicht untersucht und könnte Gegenstand künftiger Studien sein.

Eine Regulation des renalen AR in der Niere durch E2 ist bislang in keiner anderen Studie beobachtet worden. Quarmby et al. untersuchten die Autoregulation von AR mRNA in der ventralen Prostata der Ratte bzw. *in vitro* in LNCaP-Zellen, einer menschlichen Prostatakarzinom-Zelllinie [136]. Eine Behandlung mit E2 hatte weder *in vivo* noch *in vitro* Einfluss auf die Expression von AR mRNA.

4.5 Regulation von ENaC in Stimulationsexperimenten in vitro

4.5.1 Ergebnisse aus einer kortikalen Sammelrohr-Zelllinie der Maus (M1)

Die renale Zelllinie M1 stammt von gesundem Nierengewebe einer transgenen Maus (tg(SV40E)Bri7). Die Zellen haben viele Eigenschaften des kortikalen Sammelrohrs behalten, so zum Beispiel Morphologie und Antigene des kortikalen Sammelrohrs wie ENaC und CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) [169]. In vorangegangenen Experimenten konnte in elektrophysiologischen transepithelialen Messungen in der Ussing-Kammer gezeigt werden, dass M1-Zellen, die vorher mit Testosteron behandelt worden waren und durch Amilorid gehemmt wurden, einen größeren Abfall des Natriumflusses zeigten als solche Zellen, die nicht behandelt worden waren [139]. In dieser Arbeit konnte jedoch durch die quantitative Realtime-PCR Analyse eine Androgen-abhängige Regulation der mRNA der einzelnen ENaC-Untereinheiten nicht sicher beobachtet werden. Zwar fiel zunächst eine signifikante Stimulation von alpha-ENaC nach Inkubation mit 10^{-7} M Testosteron für 48 h auf, aber in weiteren Experimenten zur Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Beziehung konnte dieser Effekt nicht reproduziert werden. Ebenso ergab sich keine signifikante Stimulation von alpha-ENaC nach Behandlung mit DHT. Des Weiteren ist bekannt, dass M1-Zellen ihre physiologische Antwort auf Aldosteron-Stimulation verloren haben [169]. In dieser Arbeit konnte keine der drei ENaC-Untereinheiten durch Aldosteron stimuliert werden. Náray-Fejes-Tóth et al. haben jedoch inzwischen eine Zelllinie aus M1 entwickeln können, die den MR exprimiert und einen Natriumfluss nach Aldosteron-Stimulation entwickelt (M1-MR⁺) [170]. Wenn es gelänge, die Expression des AR durch Transfektion in diesen Zellen zu erhöhen, so wäre diese Zelllinie ein mögliches System zur Untersuchung der Wirkung von Geschlechtshormonen auf den ENaC *in vitro*.

4.5.2 Ergebnisse aus einer kortikalen Sammelrohr-Zelllinie der Ratte (RCCD2)

Die ebenfalls in dieser Arbeit untersuchte Zelllinie RCCD2 stammt aus dem kortikalen Sammelrohr der Rattenniere und ist hoch-differenziert. RCCD1-Zellen

wurden ursprünglich durch Infektion primärer kortikaler Sammelrohr-Zellen mit dem Wild-Typ Affenvirus 40 (SV40) immortalisiert [171] und ein besonders proliferativer Subklon dieser Zellen als RCCD2-Zelllinie weiterkultiviert [172]. Die Zelllinie besteht sowohl aus Hauptzellen als auch aus Schaltzellen des Sammelrohrs und zeichnete sich in Studien von Djelidi et al. charakteristischerweise durch einen hohen transepithelialen Widerstand und Ionentransport aus [172]. Im Vergleich zu RCCD1-Zellen hat die RCCD2-Zelllinie ihre Sensitivität gegenüber Aldosteron nicht verloren. RCCD2-Zellen exprimieren die Steroidrezeptoren GR und MR, die Na⁺-K⁺-ATPase, SGK1 sowie 11beta-HSD2. Des Weiteren exprimiert die Zelllinie alle Untereinheiten des ENaC, doch fiel in der vorliegenden Arbeit auf, dass die Expression von beta- und gamma-ENaC ausgesprochen schwach ist. Auf eine Untersuchung dieser beiden Untereinheiten wurde daher in den *in vitro* Stimulationsexperimenten verzichtet. Ähnlich wie bereits beschrieben [172] führte die Inkubation mit Aldosteron zu einem Anstieg der mRNA-Expression von alpha-ENaC auf mehr als 600%. Dieser Effekt war allerdings erst nach Inkubation mit 10⁻⁷ M Aldosteron sichtbar, während in Studien von Djelidi et al. bereits eine Konzentration von 10⁻⁹ M in der Lage war, diesen Expressionsunterschied zu bewirken. Es ist daher generell nicht auszuschließen, dass der durch Aldosteron bewirkte Effekt neben dem MR auch über den GR vermittelt wurde. Durch die Gabe von Spironolacton, das primär als MR-Antagonist wirkt und eine geringe Affinität für den GR besitzt, konnte jedoch die Aldosteron-Wirkung in den RCCD2-Zellen aufgehoben werden. In Anbetracht der schwachen Expression der ENaC-Untereinheiten muss zudem vermutet werden, dass die in dieser Arbeit genutzten Passagen von RCCD2-Zellen ihre ursprünglichen Eigenschaften zum Teil verloren haben könnten. Eine Expression des AR konnte in dieser Arbeit zwar auf mRNA-Ebene detektiert, aber nicht sicher im Western Immunoblot identifiziert werden. Dies erklärt, dass eine Inkubation von RCCD2 mit Testosteron und DHT keinen Einfluss auf die Expression der alpha-Untereinheit von ENaC hatte.

4.5.3 Ergebnisse aus primären Gefäßmuskelzellen der Ratte (VSMC)

Die primäre Zelllinie VSMC (vascular smooth muscle cells) wurde aus der Aorta von Sprague-Dawley-Ratten isoliert [173]. Auf mRNA-Ebene zeigte sich eine

schwache Expression von alpha-ENaC, während die beta- und gamma-Untereinheit des ENaC im Rahmen dieser Arbeit auf VSMC-Zellen nicht detektiert werden konnten. Es ist bekannt, dass glatte Gefäßmuskelzellen den ENaC exprimieren, wobei dessen genaue Rolle in diesem Kontext bislang nicht hinreichend geklärt ist. Zudem scheint es eine große Variabilität der Expression von ENaC-Untereinheiten auf glatten Gefäßmuskelzellen zu geben, die abhängig ist von Spezies, Alter und Passage der Zellkultur [174]. Es gibt Hinweise darauf, dass die ENaC-Expression im Zusammenhang mit dehnungs-induzierter Vasokonstriktion steht bzw. eine Rolle bei der Migration glatter Gefäßmuskelzellen im Rahmen von Reparationsmechanismen nach vaskulären Mikrotraumata spielt [174]. Des Weiteren ist bekannt, dass der Androgen-Rezeptor auf Endothel und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird [141] und Androgene selbst in der Lage sind, die Expression des Rezeptors heraufzuregulieren [175]. Eine Inkubation von VSMC mit Androgenen hatte in dieser Arbeit jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von alpha-ENaC mRNA. Auf die Untersuchung der anderen beiden ENaC-Untereinheiten wurde aufgrund der geringen Expression verzichtet.

4.6 Limitationen der vorliegenden Arbeit

Die in dieser Arbeit beobachtete Wirkung von Geschlechtshormonen auf die Untereinheiten von ENaC und auf den AR beschränkt sich auf deren Expression auf mRNA- und Protein-Ebene. Allerdings konnten keine Daten erhoben werden, die Rückschlüsse auf die Funktionalität des ENaC nach Androgen-Stimulation *in vivo* zulassen. Es ist zwar fraglich, ob die beobachteten Veränderungen der ENaC-Expression eine messbare Veränderung der Natriumexkretion im Urin der Ratte zur Folge gehabt hätten, zumal diese auch stark von der aufgenommenen Nahrung abhängt. Riazi et al. nutzten jedoch in einer Studie den Nachweis von ENaC-Protein im Urin der Versuchstiere als möglichen Marker für einen erhöhten ENaC-Umsatz [149]. Da die Behandlung der Wistar-Ratten, deren Nieren in dieser Arbeit untersucht wurden, ursprünglich in Würzburg stattgefunden hatte, stand nachträglich kein Urin-Probenmaterial zur Evaluierung von Nierenfunktionsparametern zur Verfügung. Deshalb wäre interessant, derartige Messungen in zukünftigen Experimenten nachzuholen. Zudem erfolgte in dieser Arbeit lediglich eine Messung von Gesamt-Protein der Niere, wobei sich die Frage stellt, ob sich die geschlechtsabhängige

Regulation der ENaC-Expression in der Niere regional unterscheidet. Strukturelle Analysen und immunohistochemische Experimente wären nötig, um die verschiedenen Abschnitte des ASDN hinsichtlich ihrer ENaC-Expression nach Gabe von Androgenen zu untersuchen. Nicht zuletzt sollte auch in Betracht gezogen werden, dass andere renale Natriumkanäle ebenfalls Angriffspunkt für Geschlechtshormone sein könnten und so zusätzlich zu Blutdruckunterschieden zwischen den Geschlechtern beitragen würden. Bislang gibt es dazu ebenfalls keine genauen Studien.

Abbildung 23 fasst die geschlechtsspezifische Regulation von ENaC und AR durch Androgene zusammen. Insgesamt ist zu bedenken, dass der Blutdruck generell auf verschiedenen Ebenen des Organismus durch Geschlechtshormone reguliert wird. Androgene, Estrogene und Progesteron haben Einfluss auf Gefäßtonus, Atherogenese, Herz, Nierenfunktion und -metabolismus sowie auf

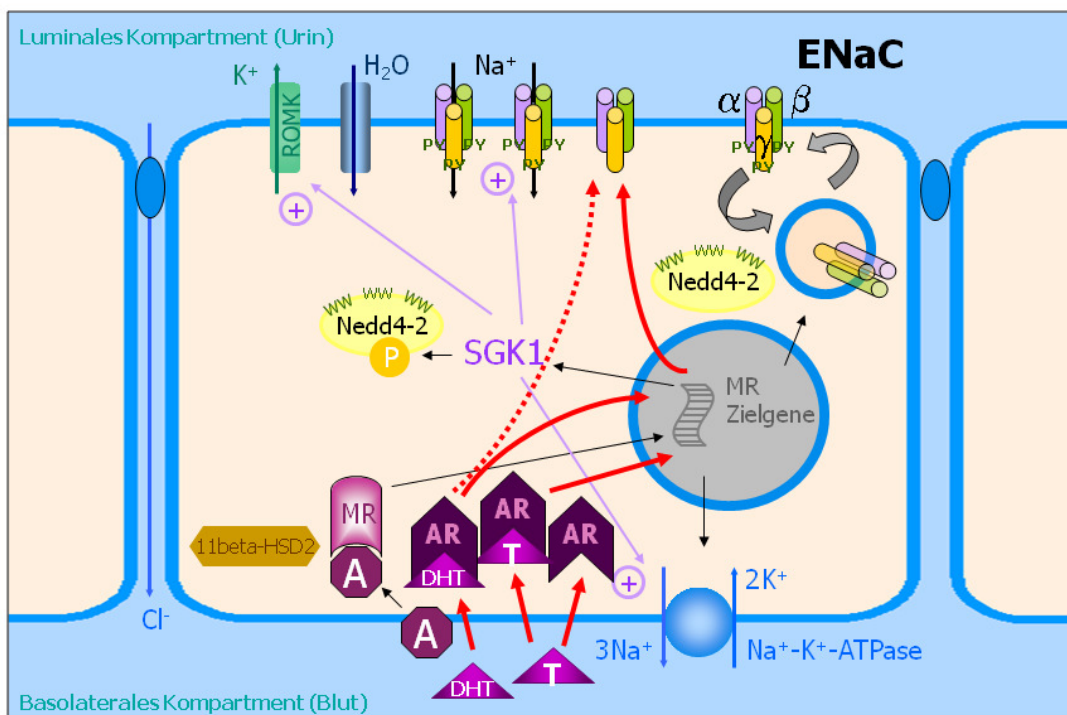


Abbildung 23: Wirkung von Androgenen auf den distalen Tubulus. Testosteron und DHT binden an den Androgen-Rezeptor (AR) und bewirken auf transkriptionellem wie auch nicht-transkriptionellem Weg eine veränderte Expression der ENaC-Untereinheiten. Diese Regulation ist geschlechtsabhängig und scheint weitere geschlechtsabhängige Faktoren zu involvieren. Der genaue Mechanismus bleibt jedoch unklar. Des Weiteren wird der AR in der Niere der Ratte ebenso geschlechtsspezifisch durch Androgene autoreguliert. Bei weiblichen Ratten hat zudem E2 einen Einfluss auf die Expression des AR (hier nicht gezeigt).

zentrale Steuerungsmechanismen des Nervensystems. Deshalb leisten die hier beschriebenen geschlechtsspezifischen Effekte von Androgenen auf die Expression des ENaC allenfalls einen Beitrag zur Blutdruckadjustierung. Weiterführende Studien *in vivo* und *in vitro* müssen zeigen, welchen Einfluss Geschlechtshormone auf die Funktion des ENaC haben. Des Weiteren werden große klinische Studien nötig sein, um eine direkte Korrelation zwischen Androgen-Spiegeln beim Menschen und Einflüssen auf das renale sowie kardiovaskuläre System zu zeigen.

5 Zusammenfassung

Mit Beginn der Pubertät steigt der normale Blutdruck bei Jungen bzw. Männern stärker an als der bei Mädchen bzw. Frauen. Diese Differenz bleibt im Erwachsenenalter zunächst bestehen, bis sich schließlich die Blutdruckwerte zwischen den Geschlechtern im höheren Lebensalter wieder angleichen. In verschiedenen Rattenmodellen fielen ebenfalls geschlechtsspezifische Blutdruckunterschiede auf, welche durch Kastration der männlichen Tiere aufgehoben werden konnten. Des Weiteren ist bekannt, dass Geschlechtshormone komplexe Effekte auf das renale und kardiovaskuläre System ausüben und eine Rolle bei der Blutdruckregulation spielen.

Der epitheliale Natriumkanal (ENaC) moduliert Natrium- und Wasserreabsorption in der Niere. Aldosteron ist einer der Hauptregulatoren des ENaC. Eine geschlechtsspezifische Regulation des ENaC insbesondere über Androgene war bislang nicht ausreichend untersucht. Androgene selbst wirken über den Androgen-Rezeptor (AR). Dessen Autoregulation durch Androgene ist sehr gewebsspezifisch und abhängig von der untersuchten Spezies sowie von deren Entwicklungsstadium.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Frage, ob es *in vivo* geschlechtsspezifische Expressionsunterschiede von ENaC und AR basal sowie nach Hormonstimulation gibt. Außerdem wurde überprüft, ob es im Promoter der untersuchten Zielproteine potentielle Regionen gibt, die eine Regulation durch Geschlechtshormone erklären. Dies erfolgte am Rattenmodell *in vivo* sowie *in vitro* an den renalen Zelllinien M1 und RCCD2 wie auch an primären Gefäßmuskelzellen der Ratte (VSMC). Dabei wurden mittels semiquantitativer und quantitativer PCR und Western Immunoblot die Expressionsniveaus aller ENaC-Untereinheiten sowie des AR auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht.

Die basale renale Expression der ENaC-Untereinheiten sowie des AR unterschied sich zwischen gonadektomierten Männchen und Weibchen nicht. Die Behandlung der männlichen Ratten mit Testosteron 500 mg/kg KG (TUD500) führte zu einer moderaten Heraufregulation von alpha-ENaC mRNA. Ebenso war alpha-ENaC Protein nach Behandlung der Männchen mit Testosteron oder 5alpha-Dihydrotestosteron (DHT) heraufreguliert. Die Expression von beta- und gamma-ENaC war bei männlichen Ratten durch Androgene unbeeinflusst, es zeigten sich

keine quantitativen Unterschiede von mRNA oder Protein in PCR oder Western Blot im Vergleich zu gonadektomierten männlichen Kontrolltieren. Im Gegensatz zu den männlichen Tieren zeigte sich bei weiblichen Wistar-Ratten eine Herunterregulation der mRNA-Expression aller ENaC-Untereinheiten durch Androgene im Vergleich zu ovariectomierten weiblichen Kontrolltieren. Dieser Effekt war signifikant nach Behandlung der Weibchen mit DHT. Die Western Blots für alpha- und beta-ENaC Protein konnten diesen Effekt bei den weiblichen Tieren bestätigen, während die Expression von gamma-ENaC Protein insgesamt sehr gering war.

In gleicher Art und Weise ergaben sich geschlechtsspezifische Unterschiede in der Autoregulation des AR. Die Gabe von TUD500 führte zu einer signifikant stärkeren Expression von renaler AR mRNA und AR Protein bei männlichen Wistar-Ratten. Im Western Blot zeigte sich zudem eine erhöhte Expression von AR Protein nach DHT Behandlung bei den Männchen. Im Gegensatz dazu bestand bei weiblichen Wistar-Ratten eher ein Trend in Richtung Suppression von AR mRNA und Protein im Vergleich zu weiblichen Kontrolltieren. Estradiol (E2) führte schließlich zu einer signifikanten Herunterregulation von AR mRNA.

Die in dieser Arbeit genutzten Zelllinien zeigten diverse Einschränkungen, die eine Untersuchung der Androgen-abhängigen Regulation des ENaC *in vitro* sehr erschwerte. Die renale Zelllinie M1 exprimiert zwar alle Untereinheiten des ENaC, hat allerdings ihre physiologische Antwort auf Aldosteron-Stimulation bereits verloren und stellt mangels Expression des AR kein optimales Modell zur Untersuchung geschlechtsspezifischer Mechanismen der ENaC-Regulation dar. Die renale Sammelrohr-Zelllinie RCCD2 exprimiert ebenfalls alle drei ENaC-Untereinheiten und zeigt im Gegensatz zu M1 eine Aldosteron- und MR-abhängige Stimulation von alpha-ENaC. Dennoch wird auch auf RCCD2-Zellen AR Protein nicht ausreichend exprimiert, so dass eine Behandlung mit Androgenen bei diesen Zellen ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression von ENaC mRNA hatte. Da bekannt ist, dass der AR auf glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) exprimiert wird, wurden diese zusätzlich hinsichtlich der Expression von ENaC und dessen Regulation untersucht. VSMC zeigte lediglich eine Expression von alpha-ENaC, wobei sich auch hier keine Regulation durch Androgene fand.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ENaC und AR geschlechtsspezifisch durch Androgene reguliert werden. Obgleich die in dieser Arbeit beschriebenen

Expressionsunterschiede signifikant, aber relativ gering sind, könnten Androgene auf diese Weise in der Lage sein, die renale Natriumreabsorption zu beeinflussen und sich somit auf den Blutdruck auszuwirken. Dies würde eine mögliche Erklärung für die beobachtbaren physiologischen Blutdruckunterschiede zwischen den Geschlechtern liefern.

6 Literaturverzeichnis

1. Wiinberg N, Hoegholm A, Christensen HR, et al. 24-h ambulatory blood pressure in 352 normal Danish subjects, related to age and gender. *Am J Hypertens* 1995;8:978-86.
2. Harshfield GA, Alpert BS, Pulliam DA, Somes GW, Wilson DK. Ambulatory blood pressure recordings in children and adolescents. *Pediatrics* 1994;94:180-4.
3. Himmelmann A, Svensson A, Hansson L. Influence of sex on blood pressure and left ventricular mass in adolescents: the Hypertension in Pregnancy Offspring Study. *J Hum Hypertens* 1994;8:485-90.
4. Yong LC, Kuller LH, Rutan G, Bunker C. Longitudinal study of blood pressure: changes and determinants from adolescence to middle age. The Dormont High School follow-up study, 1957-1963 to 1989-1990. *Am J Epidemiol* 1993;138:973-83.
5. Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 2001;37:1199-208.
6. Stamler J, Stamler R, Riedlinger WF, Algera G, Roberts RH. Hypertension screening of 1 million Americans. Community Hypertension Evaluation Clinic (CHEC) program, 1973 through 1975. *Jama* 1976;235:2299-306.
7. Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, et al. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension* 1995;25:305-13.
8. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial. *Jama* 1995;273:199-208.
9. Akkad AA, Halligan AW, Abrams K, al-Azzawi F. Differing responses in blood pressure over 24 hours in normotensive women receiving oral or transdermal estrogen replacement therapy. *Obstet Gynecol* 1997;89:97-103.
10. Pripp U, Hall G, Csemiczky G, et al. A randomized trial on effects of hormone therapy on ambulatory blood pressure and lipoprotein levels in women with coronary artery disease. *J Hypertens* 1999;17:1379-86.
11. Anastos K, Charney P, Charon RA, et al. Hypertension in women: what is really known? The Women's Caucus, Working Group on Women's Health of the Society of General Internal Medicine. *Ann Intern Med* 1991;115:287-93.
12. Khaw KT, Barrett-Connor E. Blood pressure and endogenous testosterone in men: an inverse relationship. *J Hypertens* 1988;6:329-32.
13. Messerli FH, Garavaglia GE, Schmieder RE, et al. Disparate cardiovascular findings in men and women with essential hypertension. *Ann Intern Med* 1987;107:158-61.

14. Phillips GB, Pinkernell BH, Jing TY. The association of hypotestosteronemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb* 1994;14:701-6.
15. Kalin MF, Zumoff B. Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids* 1990;55:330-52.
16. Chen MJ, Yang WS, Yang JH, et al. Relationship between androgen levels and blood pressure in young women with polycystic ovary syndrome. *Hypertension* 2007;49:1442-7.
17. Mattsson LA, Cullberg G, Hamberger L, Samsioe G, Silfverstolpe G. Lipid metabolism in women with polycystic ovary syndrome: possible implications for an increased risk of coronary heart disease. *Fertil Steril* 1984;42:579-84.
18. Soranno D, Prasad V, David R, et al. Hypertension and virilization caused by a unique desoxycorticosterone- and androgen-secreting adrenal adenoma. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999;12:215-20.
19. Talbott E, Guzick D, Clerici A, et al. Coronary heart disease risk factors in women with polycystic ovary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:821-6.
20. Sullivan ML, Martinez CM, Gennis P, Gallagher EJ. The cardiac toxicity of anabolic steroids. *Prog Cardiovasc Dis* 1998;41:1-15.
21. Chen YF, Meng QC. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. *Life Sci* 1991;48:85-96.
22. Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998;31:435-9.
23. Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K. Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000;35:480-3.
24. Crofton JT, Share L. Gonadal hormones modulate deoxycorticosterone-salt hypertension in male and female rats. *Hypertension* 1997;29:494-9.
25. Rowland NE, Fregly MJ. Role of gonadal hormones in hypertension in the Dahl salt-sensitive rat. *Clin Exp Hypertens A* 1992;14:367-75.
26. Ouchi Y, Share L, Crofton JT, Iitake K, Brooks DP. Sex difference in the development of deoxycorticosterone-salt hypertension in the rat. *Hypertension* 1987;9:172-7.
27. Ashton N, Balment RJ. Sexual dimorphism in renal function and hormonal status of New Zealand genetically hypertensive rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991;124:91-7.
28. Ganten U, Schroder G, Witt M, et al. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effects of anti-androgen treatment. *J Hypertens* 1989;7:721-6.
29. Iams SG, Wexler BC. Retardation in the development of spontaneous hypertension in SH rats by gonadectomy. *J Lab Clin Med* 1977;90:997-1003.

30. Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K, Granger JP. Gender differences in hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of androgens and androgen receptor. *Hypertension* 1999;34:920-3.
31. Kienitz T, Quinkler M. Testosterone and blood pressure regulation. *Kidney Blood Press Res* 2008;31:71-9.
32. Hanke H, Lenz C, Hess B, Spindler KD, Weidemann W. Effect of testosterone on plaque development and androgen receptor expression in the arterial vessel wall. *Circulation* 2001;103:1382-5.
33. Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P. Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation* 1995;91:1154-60.
34. Webb CM, McNeill JG, Hayward CS, de Zeigler D, Collins P. Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation* 1999;100:1690-6.
35. Teoh H, Quan A, Leung SW, Man RY. Differential effects of 17beta-estradiol and testosterone on the contractile responses of porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol* 2000;129:1301-8.
36. Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *Br J Pharmacol* 2002;135:735-40.
37. Deenadayalu VP, White RE, Stallone JN, Gao X, Garcia AJ. Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1720-7.
38. Jaffe MD. Effect of testosterone cypionate on postexercise ST segment depression. *Br Heart J* 1977;39:1217-22.
39. Rosano GM, Leonardo F, Pagnotta P, et al. Acute anti-ischemic effect of testosterone in men with coronary artery disease. *Circulation* 1999;99:1666-70.
40. Webb CM, Adamson DL, de Zeigler D, Collins P. Effect of acute testosterone on myocardial ischemia in men with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1999;83:437-9, A9.
41. Kumai T, Tanaka M, Watanabe M, Kobayashi S. Elevated tyrosine hydroxylase mRNA levels in the adrenal medulla of spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* 1994;65:367-9.
42. Kumai T, Tanaka M, Watanabe M, Nakura H, Kobayashi S. Influence of androgen on tyrosine hydroxylase mRNA in adrenal medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1995;26:208-12.
43. Zukowska-Grojec Z. Neuropeptide Y. A novel sympathetic stress hormone and more. *Ann N Y Acad Sci* 1995;771:219-33.
44. Ceballos G, Figueroa L, Rubio I, et al. Acute and nongenomic effects of testosterone on isolated and perfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:691-7.
45. Masuda A, Mathur R, Halushka PV. Testosterone increases thromboxane A2 receptors in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1991;69:638-43.

46. Matsuda K, Ruff A, Morinelli TA, Mathur RS, Halushka PV. Testosterone increases thromboxane A2 receptor density and responsiveness in rat aortas and platelets. *Am J Physiol* 1994;267:H887-93.
47. Zucker TP, Higashiura K, Mathur RS, Halushka PV. Androstenedione increases thromboxane A2 receptors in human erythroleukemia cells. *Life Sci* 1996;58:683-90.
48. Singh H, Cheng J, Deng H, et al. Vascular cytochrome P450 4A expression and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis contribute to endothelial dysfunction in androgen-induced hypertension. *Hypertension* 2007;50:123-9.
49. Giltay EJ, Hoogeveen EK, Elbers JM, et al. Effects of sex steroids on plasma total homocysteine levels: a study in transsexual males and females. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:550-3.
50. Fujimoto R, Morimoto I, Morita E, et al. Androgen receptors, 5 alpha-reductase activity and androgen-dependent proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994;50:169-74.
51. McCrohon JA, Jessup W, Handelsman DJ, Celermajer DS. Androgen exposure increases human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial cell expression of vascular cell adhesion molecule-1. *Circulation* 1999;99:2317-22.
52. Toda T, Toda Y, Cho BH, Kummerow FA. Ultrastructural changes in the comb and aorta of chicks fed excess testosterone. *Atherosclerosis* 1984;51:47-57.
53. Adams MR, Williams JK, Kaplan JR. Effects of androgens on coronary artery atherosclerosis and atherosclerosis-related impairment of vascular responsiveness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:562-70.
54. Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I, Lawaetz H, Christiansen C. Natural androgens inhibit male atherosclerosis: a study in castrated, cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 1999;84:813-9.
55. Bruck B, Brehme U, Gugel N, et al. Gender-specific differences in the effects of testosterone and estrogen on the development of atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2192-9.
56. Kolodgie FD, Jacob A, Wilson PS, et al. Estradiol attenuates directed migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Am J Pathol* 1996;148:969-76.
57. Hayashi T, Esaki T, Muto E, et al. Dehydroepiandrosterone retards atherosclerosis formation through its conversion to estrogen: the possible role of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:782-92.
58. Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. *Circ Res* 1997;81:885-92.
59. Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, et al. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 1999;103:401-6.

60. Dubey RK, Jackson EK. Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F365-88.
61. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999;340:1801-11.
62. Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK, Keller PJ. 17Beta-estradiol, its metabolites, and progesterone inhibit cardiac fibroblast growth. *Hypertension* 1998;31:522-8.
63. Dubey RK, Oparil S, Imthurn B, Jackson EK. Sex hormones and hypertension. *Cardiovasc Res* 2002;53:688-708.
64. Cambotti LJ, Cole FE, Gerall AA, Frohlich ED, MacPhee AA. Neonatal gonadal hormones and blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 1984;247:E258-64.
65. Sasaki T, Ohno Y, Otsuka K, et al. Oestrogen attenuates the increases in blood pressure and platelet aggregation in ovariectomized and salt-loaded Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens* 2000;18:911-7.
66. Sharkey LC, Holycross BJ, Park S, et al. Effect of ovariectomy and estrogen replacement on cardiovascular disease in heart failure-prone SHHF/Mcc- fa cp rats. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1527-37.
67. Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, et al. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* 1998;98:256-61.
68. Cabral AM, Vasquez EC, Moyses MR, Antonio A. Sex hormone modulation of ventricular hypertrophy in sinoaortic denervated rats. *Hypertension* 1988;11:193-7.
69. Silbiger SR, Neugarten J. The impact of gender on the progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1995;25:515-33.
70. Reckelhoff JF, Granger JP. Role of androgens in mediating hypertension and renal injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26:127-31.
71. Baylis C. Age-dependent glomerular damage in the rat. Dissociation between glomerular injury and both glomerular hypertension and hypertrophy. Male gender as a primary risk factor. *J Clin Invest* 1994;94:1823-9.
72. Mulrone SE, Woda C, Johnson M, Pesce C. Gender differences in renal growth and function after uninephrectomy in adult rats. *Kidney Int* 1999;56:944-53.
73. Hall JE, Mizelle HL, Hildebrandt DA, Brands MW. Abnormal pressure natriuresis. A cause or a consequence of hypertension? *Hypertension* 1990;15:547-59.
74. Curtis JJ, Luke RG, Dustan HP, et al. Remission of essential hypertension after renal transplantation. *N Engl J Med* 1983;309:1009-15.
75. Harrap SB, Wang BZ, MacLellan DG. Renal transplantation between male and female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1992;19:431-4.
76. Holla VR, Adas F, Imig JD, et al. Alterations in the regulation of androgen-sensitive Cyp 4a monooxygenases cause hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5211-6.

77. Guyton AC, Coleman TG, Cowley AV, Jr., et al. Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *Am J Med* 1972;52:584-94.
78. James GD, Sealey JE, Muller F, et al. Renin relationship to sex, race and age in a normotensive population. *J Hypertens Suppl* 1986;4:S387-9.
79. Schunkert H, Danser AH, Hense HW, et al. Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation* 1997;95:39-45.
80. Baltatu O, Cayla C, Iliescu R, et al. Abolition of hypertension-induced end-organ damage by androgen receptor blockade in transgenic rats harboring the mouse ren-2 gene. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2681-7.
81. Baltatu O, Cayla C, Iliescu R, Andreev D, Bader M. Abolition of end-organ damage by antiandrogen treatment in female hypertensive transgenic rats. *Hypertension* 2003;41:830-3.
82. Chen YF, Naftilan AJ, Oparil S. Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension* 1992;19:456-63.
83. Ellison KE, Ingelfinger JR, Pivor M, Dzau VJ. Androgen regulation of rat renal angiotensinogen messenger RNA expression. *J Clin Invest* 1989;83:1941-5.
84. Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* 1997;36:1-21.
85. Miller JA, Anacta LA, Cattran DC. Impact of gender on the renal response to angiotensin II. *Kidney Int* 1999;55:278-85.
86. Schunkert H, Hense HW, Andus T, Riegger GA, Straub RH. Relation between dehydroepiandrosterone sulfate and blood pressure levels in a population-based sample. *Am J Hypertens* 1999;12:1140-3.
87. Kau MM, Lo MJ, Wang SW, et al. Inhibition of aldosterone production by testosterone in male rats. *Metabolism* 1999;48:1108-14.
88. Quan A, Chakravarty S, Chen JK, et al. Androgens augment proximal tubule transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F452-9.
89. Bachmann J, Feldmer M, Ganten U, Stock G, Ganten D. Sexual dimorphism of blood pressure: possible role of the renin-angiotensin system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;40:511-5.
90. Skoog KM, Mangiapane ML. Area postrema and cardiovascular regulation in rats. *Am J Physiol* 1988;254:H963-9.
91. Rossier BC, Pradervand S, Schild L, Hummler E. Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors. *Annu Rev Physiol* 2002;64:877-97.
92. Bachmann S, Bostanjoglo M, Schmitt R, Ellison DH. Sodium transport-related proteins in the mammalian distal nephron - distribution, ontogeny and functional aspects. *Anat Embryol (Berl)* 1999;200:447-68.

93. Loffing J, Schild L. Functional domains of the epithelial sodium channel. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3175-81.
94. Garty H, Palmer LG. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev* 1997;77:359-96.
95. Renard S, Voilley N, Bassilana F, Lazdunski M, Barbry P. Localization and regulation by steroids of the alpha, beta and gamma subunits of the amiloride-sensitive Na⁺ channel in colon, lung and kidney. *Pflugers Arch* 1995;430:299-307.
96. Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 1999;104:R19-23.
97. Fuller PJ, Brennan FE, Burgess JS. Acute differential regulation by corticosteroids of epithelial sodium channel subunit and Nedd4 mRNA levels in the distal colon. *Pflugers Arch* 2000;441:94-101.
98. Snyder PM. The epithelial Na⁺ channel: cell surface insertion and retrieval in Na⁺ homeostasis and hypertension. *Endocr Rev* 2002;23:258-75.
99. Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, Gouaux E. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* 2007;449:316-23.
100. Canessa CM, Schild L, Buell G, et al. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 1994;367:463-7.
101. McDonald FJ, Price MP, Snyder PM, Welsh MJ. Cloning and expression of the beta- and gamma-subunits of the human epithelial sodium channel. *Am J Physiol* 1995;268:C1157-63.
102. Hummler E, Barker P, Gatzky J, et al. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet* 1996;12:325-8.
103. Wang Q, Hummler E, Maillard M, et al. Compensatory up-regulation of angiotensin II subtype 1 receptors in alpha ENaC knockout heterozygous mice. *Kidney Int* 2001;59:2216-21.
104. McDonald FJ, Yang B, Hrstka RF, et al. Disruption of the beta subunit of the epithelial Na⁺ channel in mice: hyperkalemia and neonatal death associated with a pseudohypoaldosteronism phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1727-31.
105. Barker PM, Nguyen MS, Gatzky JT, et al. Role of gammaENaC subunit in lung liquid clearance and electrolyte balance in newborn mice. Insights into perinatal adaptation and pseudohypoaldosteronism. *J Clin Invest* 1998;102:1634-40.
106. Rubera I, Loffing J, Palmer LG, et al. Collecting duct-specific gene inactivation of alphaENaC in the mouse kidney does not impair sodium and potassium balance. *J Clin Invest* 2003;112:554-65.
107. Loffing J, Pietri L, Aregger F, et al. Differential subcellular localization of ENaC subunits in mouse kidney in response to high- and low-Na diets. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F252-8.
108. Frindt G, Palmer LG. Na channels in the rat connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F669-74.

109. Meneton P, Loffing J, Warnock DG. Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F593-601.
110. Schild L. The epithelial sodium channel: from molecule to disease. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004;151:93-107.
111. Staub O, Abriel H, Plant P, et al. Regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 and ubiquitination. *Kidney Int* 2000;57:809-15.
112. Flores SY, Debonneville C, Staub O. The role of Nedd4/Nedd4-like dependant ubiquitylation in epithelial transport processes. *Pflugers Arch* 2003;446:334-8.
113. McCormick JA, Bhalla V, Pao AC, Pearce D. SGK1: a rapid aldosterone-induced regulator of renal sodium reabsorption. *Physiology (Bethesda)* 2005;20:134-9.
114. Hummler E, Vallon V. Lessons from mouse mutants of epithelial sodium channel and its regulatory proteins. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3160-6.
115. Thomas CP, Itani OA. New insights into epithelial sodium channel function in the kidney: site of action, regulation by ubiquitin ligases, serum- and glucocorticoid-inducible kinase and proteolysis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004;13:541-8.
116. Schulz-Baldes A, Berger S, Grahammer F, et al. Induction of the epithelial Na⁺ channel via glucocorticoids in mineralocorticoid receptor knockout mice. *Pflugers Arch* 2001;443:297-305.
117. Kleyman TR, Coupaye-Gerard B, Ernst SA. Aldosterone does not alter apical cell-surface expression of epithelial Na⁺ channels in the amphibian cell line A6. *J Biol Chem* 1992;267:9622-8.
118. Goldstein O, Asher C, Garty H. Cloning and induction by low NaCl intake of avian intestine Na⁺ channel subunits. *Am J Physiol* 1997;272:C270-7.
119. Asher C, Wald H, Rossier BC, Garty H. Aldosterone-induced increase in the abundance of Na⁺ channel subunits. *Am J Physiol* 1996;271:C605-11.
120. Epple HJ, Amasheh S, Mankertz J, et al. Early aldosterone effect in distal colon by transcriptional regulation of ENaC subunits. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278:G718-24.
121. Loffing J, Zecevic M, Feraille E, et al. Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F675-82.
122. Mick VE, Itani OA, Loftus RW, et al. The alpha-subunit of the epithelial sodium channel is an aldosterone-induced transcript in mammalian collecting ducts, and this transcriptional response is mediated via distinct cis-elements in the 5'-flanking region of the gene. *Mol Endocrinol* 2001;15:575-88.
123. Ecelbarger CA, Kim GH, Terris J, et al. Vasopressin-mediated regulation of epithelial sodium channel abundance in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F46-53.

124. Marunaka Y, Hagiwara N, Tohda H. Insulin activates single amiloride-blockable Na channels in a distal nephron cell line (A6). *Am J Physiol* 1992;263:F392-400.
125. Kellenberger S, Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev* 2002;82:735-67.
126. Kamenicky P, Viengchareun S, Blanchard A, et al. Epithelial Sodium Channel Is a Key Mediator of Growth Hormone-Induced Sodium Retention in Acromegaly. *Endocrinology* 2008.
127. Kimura N, Mizokami A, Oonuma T, Sasano H, Nagura H. Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *J Histochem Cytochem* 1993;41:671-8.
128. Takeda H, Chodak G, Mutchnik S, Nakamoto T, Chang C. Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono- and polyclonal antibodies to androgen receptor. *J Endocrinol* 1990;126:17-25.
129. Wilson CM, McPhaul MJ. A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Mol Cell Endocrinol* 1996;120:51-7.
130. Boulkroun S, Le Moellic C, Blot-Chabaud M, Farman N, Courtois-Coutry N. Expression of androgen receptor and androgen regulation of NDRG2 in the rat renal collecting duct. *Pflugers Arch* 2005;451:388-94.
131. Wahli W, Martinez E. Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression. *Faseb J* 1991;5:2243-9.
132. Dai JL, Burnstein KL. Two androgen response elements in the androgen receptor coding region are required for cell-specific up-regulation of receptor messenger RNA. *Mol Endocrinol* 1996;10:1582-94.
133. Shan LX, Zhu LJ, Bardin CW, Hardy MP. Quantitative analysis of androgen receptor messenger ribonucleic acid in developing Leydig cells and Sertoli cells by in situ hybridization. *Endocrinology* 1995;136:3856-62.
134. Prins GS, Woodham C. Autologous regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid in the separate lobes of the rat prostate gland. *Biol Reprod* 1995;53:609-19.
135. Keller ET, Ershler WB, Chang C. The androgen receptor: a mediator of diverse responses. *Front Biosci* 1996;1:d59-71.
136. Quarmby VE, Yarbrough WG, Lubahn DB, French FS, Wilson EM. Autologous down-regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol* 1990;4:22-8.
137. Gonzalez-Cadavid N, Vernet D, Fuentes Navarro A, et al. Up-regulation of the levels of androgen receptor and its mRNA by androgens in smooth-muscle cells from rat penis. *Mol Cell Endocrinol* 1993;90:219-29.
138. Kerr JE, Allore RJ, Beck SG, Handa RJ. Distribution and hormonal regulation of androgen receptor (AR) and AR messenger ribonucleic acid in the rat hippocampus. *Endocrinology* 1995;136:3213-21.

139. Quinkler M, Bujalska IJ, Kaur K, et al. Androgen receptor-mediated regulation of the alpha-subunit of the epithelial sodium channel in human kidney. *Hypertension* 2005;46:787-98.
140. Song J, Hu X, Khan O, et al. Increased blood pressure, aldosterone activity, and regional differences in renal ENaC protein during vasopressin escape. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F1076-83.
141. Sinha-Hikim I, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Zheng W, Bhasin S. Androgen receptor in human skeletal muscle and cultured muscle satellite cells: up-regulation by androgen treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5245-55.
142. Quinkler M, Bumke-Vogt C, Meyer B, et al. The human kidney is a progesterone-metabolizing and androgen-producing organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2803-9.
143. Gardner FH, Gorshein D. Regulation of erythropoiesis by androgens. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1973;84:60-70.
144. Fisher JW, Langston JW. Effects of testosterone, cobalt and hypoxia on erythropoietin production in the isolated perfused dog kidney. *Ann N Y Acad Sci* 1968;149:75-87.
145. Zucali JR, Mirand EA. Effect of testosterone and oestradiol on erythropoietin production in vitro. *Br J Haematol* 1977;35:639-45.
146. Coviello AD, Kaplan B, Lakshman KM, et al. Effects of graded doses of testosterone on erythropoiesis in healthy young and older men. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:914-9.
147. Voegeli TA, Kurtz A, Grimm MO, Effert P, Eckardt KU. Anemia under androgen deprivation: influence of flutamide, cyproteroneacetate and orchiectomy on the erythropoietin system. *Horm Metab Res* 2005;37:89-93.
148. Navarro JF. In the erythropoietin era, can we forget alternative or adjunctive therapies for renal anaemia management? The androgen example. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2222-6.
149. Riazi S, Madala-Halagappa VK, Hu X, Ecelbarger CA. Sex and body-type interactions in the regulation of renal sodium transporter levels, urinary excretion, and activity in lean and obese Zucker rats. *Genet Med* 2006;3:309-27.
150. Gambling L, Dunford S, Wilson CA, McArdle HJ, Baines DL. Estrogen and progesterone regulate alpha, beta, and gammaENaC subunit mRNA levels in female rat kidney. *Kidney Int* 2004;65:1774-81.
151. Swezey N, Tchepichev S, Gagnon S, Fertuck K, O'Brodovich H. Female gender hormones regulate mRNA levels and function of the rat lung epithelial Na channel. *Am J Physiol* 1998;274:C379-86.
152. Yamamoto KR. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu Rev Genet* 1985;19:209-52.
153. Nelson CC, Hendy SC, Shukin RJ, et al. Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: evidence for differential steroid receptor response elements. *Mol Endocrinol* 1999;13:2090-107.

154. Parker MG, Webb P, Needham M, White R, Ham J. Identification of androgen response elements in mouse mammary tumour virus and the rat prostate C3 gene. *J Cell Biochem* 1987;35:285-92.
155. Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 1989;56:335-44.
156. Klock G, Strahle U, Schutz G. Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct. *Nature* 1987;329:734-6.
157. Bremner HR, Freywald T, O'Brodovich HM, Otulakowski G. Promoter analysis of the gene encoding the beta-subunit of the rat amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L124-34.
158. Thomas CP, Auerbach SD, Zhang C, Stokes JB. The structure of the rat amiloride-sensitive epithelial sodium channel gamma subunit gene and functional analysis of its promoter. *Gene* 1999;228:111-22.
159. Racusen LC, Monteil C, Sgrignoli A, et al. Cell lines with extended in vitro growth potential from human renal proximal tubule: characterization, response to inducers, and comparison with established cell lines. *J Lab Clin Med* 1997;129:318-29.
160. Takeda AN, Pinon GM, Bens M, et al. The synthetic androgen methyltrienolone (r1881) acts as a potent antagonist of the mineralocorticoid receptor. *Mol Pharmacol* 2007;71:473-82.
161. Pelletier G. Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol Histopathol* 2000;15:1261-70.
162. Riazi S, Maric C, Ecelbarger CA. 17-beta Estradiol attenuates streptozotocin-induced diabetes and regulates the expression of renal sodium transporters. *Kidney Int* 2006;69:471-80.
163. McNicholas CM, Canessa CM. Diversity of channels generated by different combinations of epithelial sodium channel subunits. *J Gen Physiol* 1997;109:681-92.
164. Faber PW, van Rooij HC, van der Korput HA, et al. Characterization of the human androgen receptor transcription unit. *J Biol Chem* 1991;266:10743-9.
165. Blok LJ, Themmen AP, Peters AH, et al. Transcriptional regulation of androgen receptor gene expression in Sertoli cells and other cell types. *Mol Cell Endocrinol* 1992;88:153-64.
166. Baarends WM, Themmen AP, Blok LJ, et al. The rat androgen receptor gene promoter. *Mol Cell Endocrinol* 1990;74:75-84.
167. Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* 2002;16:2181-7.
168. Huhtaniemi IT, Pye SR, Limer KL, et al. Increased Estrogen Rather Than Decreased Androgen Action Is Associated with Longer Androgen Receptor CAG Repeats. *J Clin Endocrinol Metab* 2008.
169. Bens M, Chassin C, Vandewalle A. Regulation of NaCl transport in the renal collecting duct: lessons from cultured cells. *Pflugers Arch* 2006;453:133-46.

170. Naray-Fejes-Toth A, Snyder PM, Fejes-Toth G. The kidney-specific WNK1 isoform is induced by aldosterone and stimulates epithelial sodium channel-mediated Na⁺ transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:17434-9.
171. Blot-Chabaud M, Laplace M, Cluzeaud F, et al. Characteristics of a rat cortical collecting duct cell line that maintains high transepithelial resistance. *Kidney Int* 1996;50:367-76.
172. Djelidi S, Beggah A, Courtois-Coutry N, et al. Basolateral translocation by vasopressin of the aldosterone-induced pool of latent Na-K-ATPases is accompanied by alpha1 subunit dephosphorylation: study in a new aldosterone-sensitive rat cortical collecting duct cell line. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1805-18.
173. Molnar GA, Lindschau C, Dubrovskaja G, et al. Glucocorticoid-related signaling effects in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2008;51:1372-8.
174. Grifoni SC, Gannon KP, Stec DE, Drummond HA. ENaC proteins contribute to VSMC migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H3076-86.
175. Ma R, Wu S, Lin Q. Homologous up-regulation of androgen receptor expression by androgen in vascular smooth muscle cells. *Horm Res* 2005;63:6-14.

7 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Marcus Quinkler und auch Herrn Prof. Dr. med. Christian Strasburger für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Dissertation in ihrer Forschungsgruppe, für ihre motivierende Betreuung und für ihr Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. med. Herbert Lochs danke ich für die Möglichkeit, in seiner Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Charité Universitätsmedizin Berlin promovieren zu können. Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Bruno Allolio und dessen Mitarbeitern der Universitätsklinik Würzburg für die freundliche Bereitstellung der Rattennieren, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Zudem danke ich allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinischen Endokrinologie, sowie Herrn Prof. Dr. med. Josef Köhrle und dessen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Endokrinologie der Charité Universitätsmedizin Berlin für deren hilfreiche Unterstützung und hervorragende Zusammenarbeit. Ich danke dem Institut für Radiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin für die freundliche Genehmigung zur Mitbenutzung ihrer Geräte. Ebenso gilt mein Dank Frau Prof. Carolyn M. Ecelbarger der Georgetown University, USA für die Bereitstellung der Antikörper, sowie Herrn Prof. Brian Harvey des Royal College of Surgeons, Irland und Frau Priv.-Doz. Dr. med. Anette Fiebeler der Charité Universitätsmedizin Berlin für die freundliche Bereitstellung der Zelllinien RCCD2 und VSMC.

Von Herzen danke ich meinen Eltern und meinem Bruder für ihre moralische Unterstützung und all meinen Freunden für ihr stets offenes Ohr nicht nur während Promotionszeiten.

8 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Tina Kienitz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema *Regulation des epithelialen Natriumkanals der Niere (ENaC) durch Androgene* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 1. Februar 2009

Tina Kienitz

9 Lebenslauf

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

Berlin, den 1. Februar 2009

Tina Kienitz

10 Publikationen

Folgende Arbeiten wurden von Tina Kienitz bislang veröffentlicht.

Originalarbeiten

1. Kienitz T, Quinkler M. Osteoporose – Aktuelle Diagnostik und Therapie. *Aktuel Ernaehr Med* 2007;32:25-30.
2. Kienitz T, Quinkler M, Strasburger CJ, Ventz M. Long-term management in five cases of TSH-secreting pituitary adenomas: a single center study and review of the literature. *Eur J Endocrinol* 2007;157(1):39-46.
3. van der Klaauw AA*, Kienitz T*, Strasburger CJ, Smit JW, Romijn JA. Malignant pituitary corticotroph adenomas: report of two cases and a comprehensive review of the literature. *Pituitary* 2009;12(1):57-69, * gleichberechtigte Erstautoren.
4. Kienitz T, Quinkler M. Testosterone and blood pressure regulation. *Kidney Blood Press Res* 2008;31(2):71-79.
5. Kienitz T, Quinkler M. Verbesserung der Insulinsensitivität – Möglichkeiten und Grenzen der Pharmakotherapie. *Aktuel Ernaehr Med* 2008;33:62-69.
6. Konopelska S, Kienitz T, Hughes B, Pirlich M, Bauditz J, Lochs H, Strasburger CJ, Stewart PM, Quinkler M. Hepatic 11beta-HSD1 mRNA expression in fatty liver and non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;70(4):554-60.
7. Kienitz T, Allolio B, Strasburger CJ, Quinkler M. Sex-specific regulation of ENaC and androgen receptor in female rat kidney. *Horm Metab Res* 2009;41(5):356-62.

Abstracts

1. Kienitz T, Allolio B, Strasburger CJ, Quinkler M. Testosterone treatment in rats increases expression of the alpha-subunit of the epithelial sodium channel (alpha-ENaC) in the kidney. 50th Annual Meeting of the German Society of Endocrinology (DGE) & 23rd Meeting of the Dutch Endocrine Society 2006, Essen, Deutschland, P14-176.
2. Kienitz T, Allolio B, Strasburger CJ, Quinkler M. Renal expression of alpha-ENaC is increased in testosterone treated rats. 8th European Congress of Endocrinology 2006, Glasgow, UK, P302.
3. Kienitz T, Allolio B, Strasburger CJ, Quinkler M. Expression of alpha-ENaC is increased in kidneys of testosterone treated rats – possible mechanism for gender-specific blood pressure regulation. 88th Annual Meeting of the Endocrine Society, ENDO 2006, Boston, USA, P3-437.
4. Kienitz T, Allolio B, Strasburger CJ, Quinkler M. Possible mechanism for gender-specific blood pressure regulation: Expression of alpha-ENaC is increased in kidneys of testosterone treated rats. 3. Berliner Symposium "Geschlechterforschung in der Medizin" 2006, Berlin, Deutschland, G7.

5. Kienitz T, Allolio B, Strasburger CJ, Quinkler M. Expression of alpha-ENaC is increased in kidneys of testosterone treated rats – Possible mechanism for gender-specific blood pressure regulation. Hypertonie 2006, München, Deutschland, E18.
6. Konopelska S, Kienitz T, Pirlich M, Bauditz J, Stewart PM, Lochs H, Strasburger CJ, Quinkler M. Hepatic mRNA expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11beta-HSD1) in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH). 51. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie gemeinsam mit der 12. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Endokrinologie und Stoffwechsel 2007, Salzburg, Österreich, P01-122.
7. Kienitz T, Allolio B, Strasburger CJ, Quinkler M. Increase of kidney androgen receptor and ENaC subunits in androgen-treated rats – new insight into gender-specific blood pressure regulation. 89th Annual Meeting of the Endocrine Society, ENDO 2007, Toronto, Kanada, P1-596.
8. Konopelska S, Kienitz T, Pirlich M, Bauditz J, Stewart PM, Hughes B, Lochs H, Strasburger CJ, Quinkler M. Abdominal obesity is associated with decreased hepatic mRNA expression of 11beta-HSD1 in patients with NAFLD or NASH. 89th Annual Meeting of the Endocrine Society, ENDO 2007, Toronto, Kanada, P2-79.
9. Kienitz T, Allolio B, Strasburger C, Quinkler M. Increase of kidney androgen receptor and ENaC subunits in androgen-treated rats – new insight into gender-specific blood pressure regulation. 6th International Symposium on “Aldosterone and ENaC: from gene to disease”, October 2007, Zermatt, Schweiz, P15.
10. Kienitz T, Allolio B, Strasburger C, Quinkler M. Androgen treatment in female rats decreases expression of subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) in the kidney. 90th Annual Meeting of the Endocrine Society, ENDO 2008, San Francisco, USA, P1-448.
11. Kienitz T, Hofmann P, Michaelis M, Goetz F, Quinkler M. Androgen treatment in orchietomized male rats increases blood pressure similar to high salt diet. 90th Annual Meeting of the Endocrine Society, ENDO 2008, San Francisco, USA, P2-7.