

4. Diskussion

Es ist von einer neuen Sicht der Bedeutung des Aldosterons für den kardiovaskulären Endorganschaden auszugehen. Die Intervention zur Reduktion der Aldosteronspiegel ist aufgrund der Interpretation der Ergebnisse klinischer Studien aus den letzten Jahren zu einem wichtigen Anliegen bei der medikamentösen Behandlung kardiovaskulärer und renaler Erkrankungen geworden. Dabei sind die Auswirkungen von Aldosteron auf den Körper und die zellbiologischen Mechanismen, die von Aldosteron beeinflusst werden, bisher nicht vollständig aufgeklärt. Ein Einblick in die Aldosteron-induzierten Effekte kann als unerlässliche Voraussetzung für die Auswahl einer die Aldosteronwirkung beeinträchtigenden Substanz gewertet werden. Neben zahlreichen Medikamenten, von denen anzunehmen ist, dass sie die Wirkung des Aldosterons indirekt antagonisieren, stehen uns mit Spironolakton und Eplerenon derzeit nur MR-Blocker zur Verfügung, die direkt zur Behandlung des Hyperaldosteronismus eingesetzt werden können. Die Nebenwirkungen dieser Präparate begrenzen allerdings ihren Einsatz wegen der Begünstigung einer Kaliumretention und der sich daraus entwickelnden Hyperkaliämie. So beschrieben Juurlink et al. für Kanada eine Verfünffachung der Verschreibungsrate für Spironolakton seit der Veröffentlichung der RALES-Daten 1999 und damit verbunden eine dreimal höhere Hospitalisierungsrate wegen Hyperkaliämie (1994: 2,4 pro 1000 versus 2001: 11 pro 1000 Patienten)²⁹. Die damit assoziierte Mortalität stieg von 0,3 auf 2,0 pro 1000 Patienten. Mit dem Verständnis der molekularen Grundlagen der Aldosteronwirkung und der Aktionen des MR wird es möglich sein, spezifischer an Mittlermolekülen für Endorganschäden einzugreifen und so die unerwünschten Nebenwirkungen verhindern zu können. Es lag in der

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Effekte des Aldosterons und seines Rezeptors *in vivo* und *in vitro* zu erlangen.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gilt Angiotensin II als zentraler Mittler bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von lokalen Entzündungs- und Gewebeumbauprozessen. Angiotensin II-Antagonisten sind bei der Therapie kardiovaskulärer und renaler Erkrankungen etabliert. In den letzten Jahren ist es gelungen, Signalwege, die bei der Entwicklung eines Angiotensin II-induzierten Endorganschadens eine Rolle spielen, zu definieren. Unsere Inhibitorenstudien im Angiotensin II-abhängigen Rattenmodell haben gezeigt, dass zahlreiche Mittlermoleküle wie G-Proteine, Sauerstoffradikale, Endothelin, Kalzium-Kanäle, der Arachidonsäurestoffwechsel und das Immunsystem an der Ausprägung des Angiotensin II-induzierten Endorganschadens beteiligt sind³⁰⁻³⁵. Die komplexe Interaktion der verschiedenen Signalkaskaden findet auch unter normalen Blutdruckverhältnissen statt. Der rasch progrediente Gewebeschaden kann im Tiermodell durch Unterbrechung eines dieser Signalwege auch bei weiter bestehendem hohem Blutdruck aufgehalten werden. So wiesen Anderson et al. bereits 1986 darauf hin, dass eine alleinige Blutdrucksenkung mit Hydralazin, Hydrochlorothiazid und Reserpin nicht ausreicht, um im Rattenmodell vor einer Bluthochdruck-getriggerten fortschreitenden Nierenerkrankung zu schützen. Die Behandlung mit dem ACE-Hemmer Enalapril war dagegen wirksam³⁶. Su et al. untersuchten in Mesenterialarterien und Karotiden die Folgen einer gleichzeitigen Infusion des vasokonstriktorisch wirkenden Angiotensin II und von Hydralazin, einem Vasodilatator, auf die Zellproliferation. Trotz einer effektiven Vasodilatation induzierte Angiotensin II die Proliferation der glatten Muskelzellen³⁷.

Die frühen und späten Effekte von Angiotensin II und Aldosteron und ihre komplexe Interaktion mit anderen Signalwegen in der Zelle sind zum Teil sehr ähnlich, obwohl die Struktur beider Moleküle und die Funktionsweise ihrer Rezeptoren als unterschiedlich angesehen werden. Das Peptid Angiotensin II bindet an einen membranständigen und G-Protein-gekoppelten Rezeptor; daran schließt sich eine frühe, nicht-transkriptionelle Signaltransduktion an. Diese beinhaltet u.a. die Aktivierung von PKC und MAP-Kinasen, die Produktion freier Sauerstoffradikale, die Phosphorylierung von G-Proteinen und die Aktivierung der PI3-Kinase (*phosphatidylinositol 3 kinase*)³⁸. Die Folgen chronisch erhöhter zirkulierender und lokaler Angiotensin II-Spiegel sind Gewebeentzündung und Fibrose. Das Steroid Aldosteron bindet an den MR im Zytoplasma. Nach der Bindung von Aldosteron transloziert der Aldosteron-MR-Komplex in den Zellkern und löst die Transkription von Aldosteron-induzierten Proteinen aus (sogenannte genomische Effekte). Seit Jahren werden zusätzlich nicht-transkriptionelle Effekte (auch nicht-genomische Effekte genannt) von Aldosteron beschrieben; und da die beobachteten Effekte in der Zelle mit Spironolakton nicht blockierbar waren, wurde ein zweiter, möglicherweise membranständiger Rezeptor postuliert³⁹. Dieser konnte bis heute nicht isoliert werden. In der Zwischenzeit haben verschiedene Arbeitsgruppen die nicht-transkriptionellen Effekte von Aldosteron untersucht. Liu et al. beschrieben die Aldosteron-induzierte ERK-Phosphorylierung in glatten Muskelzellen⁴⁰. Unsere Experimente charakterisierten die Aldosteron-ausgelöste Phosphorylierung von MAP-Kinasen und die Interaktion von Aldosteronsignalen mit Sauerstoffradikalen und dem EGFR. Alle diese Effekte werden über den MR vermittelt. Braun et al. zeigten, dass Aldosteron innerhalb von 2 min die Tyrosinkinase Src aktiviert, auch dieser

Effekt ist mit Spironolakton blockierbar ⁴¹. Auf der Basis der jüngeren Ergebnisse ist nicht von der Existenz eines zusätzlichen Rezeptors für Aldosteron auszugehen.

Aldosteron löst nicht nur Angiotensin II-ähnliche frühe Effekte in glatten Muskelzellen aus, es kommt offenbar auch zu einer direkten Interaktion zwischen Angiotensin II und Aldosteron. Frühe Effekte von Steroiden und die Interaktion von Steroidrezeptoren mit intrazellulären Kinasen wurden von Simoncini et al. auch für den Östrogenrezeptor beschrieben ⁴². Wie allerdings beide Signalwege konvergieren, ist bis jetzt nicht bekannt. Unsere Daten zur Interaktion zwischen MR und dem Angiotensin II-Rezeptor weisen auf Mittlermoleküle proximal des EGFR hin. Diese Vermutung stützt sich auf die Ergebnisse mit Inhibitoren. Die Aldosteron- ausgelöste frühe Signaltransduktion wird über Sauerstoffradikale und den EGFR vermittelt und der MR-Blocker Spironolakton hemmt neben der Aldosteron-induzierten auch die Angiotensin II-induzierte, aber nicht die EGF-induzierte Signaltransduktion. Seshiah et al. untersuchten die Angiotensin II-induzierte Signaltransduktion und fassten ihre Ergebnisse in einem *feed-forward*-Modell zusammen ³⁸. Danach kommt es innerhalb der ersten 30 sec. nach Bindung von Angiotensin II an seinen Rezeptor zur Aktivierung der Proteinkinase C und zu nachfolgender Stimulation der NADPH-Oxidase. Die gebildeten Sauerstoffradikale induzieren die Phosphorylierung von MAP-Kinasen und die Aktivierung von Tyrosinkinase, durch die der EGFR ebenfalls phosphoryliert wird. Der aktivierte EGFR bedingt die Phosphorylierung der PI3-Kinase und kleiner G-Proteine wie Rac, welche zur potenzierenden Generierung von Sauerstoffradikalen beiträgt und damit auch die Aktivierung der MAP-Kinasen verstärkt. Der mögliche Interaktionsraum für Aldosteron und Spironolakton ist in **Abbildung 15** dargestellt.

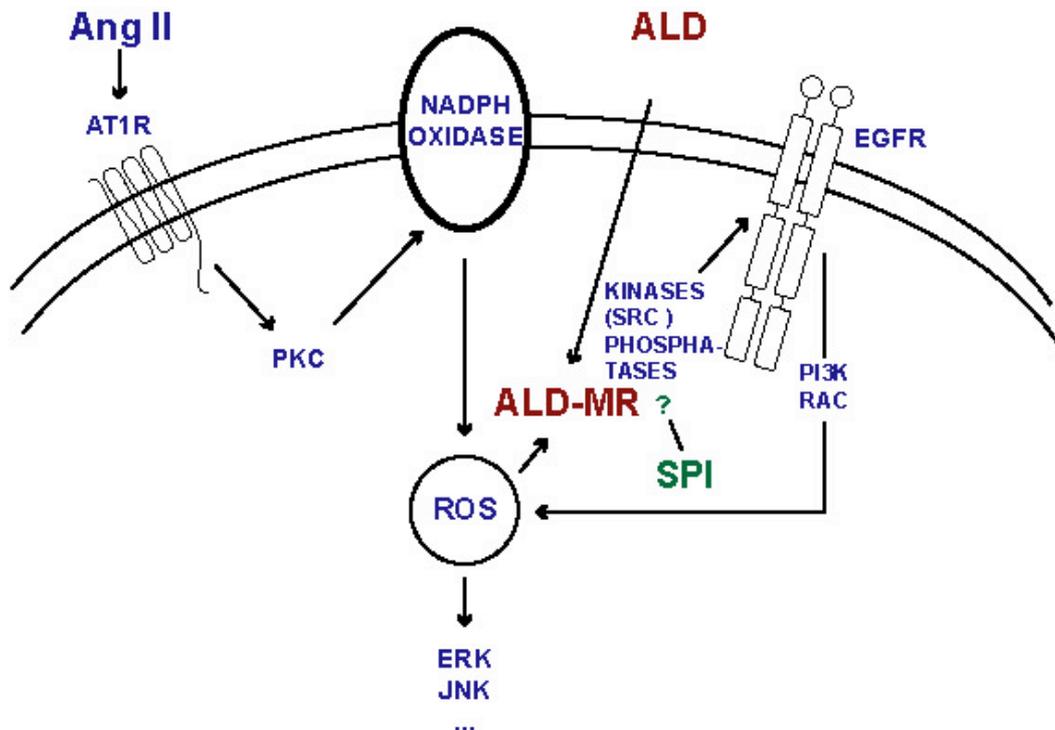


Abbildung 15: Interaktion zwischen Aldosteron und Angiotensin II. Die Abbildung ist nach dem Schema von Seshiah et al. modifiziert (siehe Text) und stellt einen möglichen Interaktionsmechanismus für Angiotensin II, Aldosteron und Spironolakton dar.

Die beobachtete Interaktion zwischen Aldosteron und Angiotensin II führt nicht nur zur Potenzierung der frühen Signaltransduktion. Nach Xiao et al. wird auch die Angiotensin II-induzierte Zellproliferation von glatten Muskelzellen durch Aldosteron *in vitro* verstärkt⁴³. Diese Beobachtung könnte u.a. auch die von Schiffrin beschriebene Erhöhung der Rezeptor-Dichte für den Angiotensin II-Rezeptor durch Aldosteron erklären⁴⁴. Aldosteron interagiert *in vitro* in glatten Muskelzellen ebenfalls mit der Signaltransduktion von Endothelin, einem weiteren Membran-gebundenen Rezeptor. Diese Interaktion ist gleichfalls durch Spironolakton blockierbar⁴⁵. In *in-vitro*-Kontraktionsversuchen mit Aortenringen konnte zudem eine Interaktion von Aldosteron mit der Phenylephrin-induzierten Gefäßkontraktion, die bereits innerhalb von 2 min induziert wird, gezeigt werden⁴⁰. Dabei waren die beobachteten Effekte

vom Vorhandensein eines intakten Endothels abhängig. Bei intaktem Endothel verhinderte Aldosteron in physiologischer Konzentration die Phenylephrin-vermittelte Gefäßkontraktion. In Gefäßen ohne Endothel verursachte Aldosteron hingegen eine Verstärkung der Phenylephrin-vermittelten Kontraktion. Die Aldosteron-vermittelten Effekte waren durch Spironolakton blockierbar. Schmidt et al. untersuchten die akuten Effekte von Aldosteron auf die Armdurchblutung beim Menschen. Sie konnten zeigen, dass Aldosteron den Blutfluss innerhalb von Minuten verstärkt und die Effekte von Phenylephrin auf den Blutfluss moduliert ⁴⁶. Farquharson et al. demonstrierten, dass Spironolakton die Armdurchblutung verbessert und die Konversion vom inaktiven Angiotensin I in das vasoaktive Angiotensin II herabsetzt ⁴⁷. Diese Ergebnisse weisen zum einen auf eine physiologische Rolle von Aldosteron für das Gleichgewicht des Gefäßtonus hin, zum anderen sind sie Indiz für die komplexe Interaktion von Aldosteron mit anderen Signalwegen.

Nach unseren tierexperimentellen Daten spielen zahlreiche Signalwege beim Angiotensin II-vermittelten Endorganschaden eine Rolle. Das Ausmaß der Rolle des ebenfalls erhöhten Aldosterons bei diesen Interaktionen ist nicht verstanden. In Gefäßen von DOCA (DeoxyKortikosteronacetat)-Salz behandelten Ratten (also einem Modell für den Aldosteron-induzierten Endorganschaden) führte die Inaktivierung des G-Proteins Rac1 zu einer Reduktion der Bildung von Sauerstoffradikalen und zur verminderten Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 ⁴⁸. Stockand et al. wiesen darauf hin, dass Aldosteron die Expression des G-Proteins K-Ras reguliert, und Staruschenko et al. beschrieben, dass K-Ras als ein wichtiger Mediator für die frühen Aldosteron-vermittelten Effekte gelten kann ^{49,50}. Es ist möglich, dass der Erfolg der Statinbehandlung bei unserem dTGR-Modell auch auf die Hemmung von Aldosteron-aktivierten G-Proteinen zurückzuführen ist.

Gleiches ist für die dTGR-Studien mit anderen Inhibitoren diskutierbar. Zu der oben vorgestellten Lacidipin-Untersuchung wurden von Ahokas et al. jetzt Daten publiziert, die den therapeutischen Effekt des dem Lacidipin verwandten Kalziumkanalblockers Amlodipin beim Aldosteron-induzierten kardialen Endorganschaden unterstreichen: Amlodipin verhinderte in diesem Modell die Infiltration von Entzündungszellen und reduzierte die Bildung freier Sauerstoffradikale ⁵¹.

Ein bedeutsames Mittlerprotein für den Endorganschaden könnte die Rezeptortyrosinkinase Axl (vom griechischen Wort *anexelekto*, deutsch: das Unkontrollierte) und ihr Ligand Gas6 (*growth arrest specific protein 6*) sein. Ursprünglich aus mononukleären Zellen eines Patienten mit Chronischer myeloischer Leukämie isoliert, wurde Axl zunächst als eine Tyrosinkinase, die *in vitro* eine neoplastische Zelltransformation auslöst, beschrieben ⁵². Die zentrale Bedeutung des Gas6-/Axl- Weges für die entzündliche mesangiale Zellproliferation wurde von Yanagita et al. gezeigt, die unter spezifischer Inhibition des Gas6-/Axl-Signalweges keine Thy1-Nephritis im Tiermodell induzieren konnten ⁵³. Auch Gas6-Knockout-Mäuse waren vor der Entwicklung einer nephrotoxischen Glomerulonephritis geschützt ⁵⁴. Bereits 1998 belegten Melaragno et al., dass die Expression von Gas6 und Axl *in vitro* in glatten Muskelzellen durch Angiotensin II stimulierbar ist ⁵⁵. Auch Aldosteron führt unter gleichen Bedingungen zur verstärkten Proteinexpression (s.o., **Abb. 14**). Beide Proteine sind sowohl im Angiotensin II- abhängigen Tiermodell als auch im humanen Nierengewebe bei verschiedenen nephrologischen Erkrankungen stärker exprimiert ⁵⁶. Möglicherweise vermittelt dieser Signalweg die Effekte des lokalen RAAS.

Die Aldosteron-MR-Achse spielt bei der Ausprägung des Endorganschadens eine wichtige Rolle. Fitzgibbon et al. verglichen die Entwicklung der *remnant*

nephropathy, einer Nierenschädigung nach Entfernung von 5/6 des Nierengewebes, bei Wistar- und Wistar-Furth-Ratten ⁵⁷. Wistar-Furth-Ratten sind resistent gegen Mineralokortikoide und in diesem Schädigungsmodell vor der Entwicklung einer Albuminurie und einer glomerulären Schädigung im Gegensatz zu den Mineralokortikoid-sensiblen Wistar-Ratten geschützt. Wir konnten demonstrieren, dass die alleinige Behandlung der Tiere mit einem Aldosteron-Rezeptor-Blocker den Angiotensin II-induzierten Endorganschaden hemmt. Auch nach Rocha et al. verhindert der MR-Blocker Eplerenon den Angiotensin II-vermittelten Endorganschaden ⁵⁸. De Paula et al. untersuchten den Effekt von Eplerenon auf die Herz- und Nierenfunktion bei Hunden, die eine fettangereicherte Diät bekamen ⁵⁹. Der MR-Blocker reduzierte die in der Kontrollgruppe beobachtete erhöhte Retention von Salz und Wasser, die glomeruläre Hyperfiltration und die Entwicklung des Bluthochdrucks. In einem Rattenmodell der SHRSP (*stroke prone hypertensive rats*) demonstrierten Chander et al., dass nur Aldosteron und nicht Angiotensin II für die Salz-induzierte thrombotische Mikroangiopathie in der Niere verantwortlich ist ⁶⁰. Dabei wurde die Ausprägung der thrombotischen Mikroangiopathie durch die Entfernung der Nebennieren und damit des zirkulierenden Aldosterons verhindert und danach die Effekte der chronischen Gabe von Angiotensin II mit jener von Aldosteron verglichen. Die Studie von Chander et al. kennzeichnet nicht nur die zentrale Rolle des Aldosterons bei der Ausprägung des Endorganschadens, sondern auch, dass nach Adrenalektomie und somit nach Entfernung des zirkulierenden Aldosterons die lokale Synthese von Aldosteron nicht ausreicht, um den Endorganschaden auszulösen. Nach Gomez-Sanchez et al. sind die Aldosteronspiegel im Herzen von der Aldosteronproduktion in den Nebennieren abhängig ²⁴. Aufgrund unserer Ergebnisse der Adrenalektomie-Studie spielt im

dTGR-Tiermodell auch das zirkulierende Aldosteron die entscheidende Rolle für lokale Aldosteronspiegel und einen möglichen Angiotensin II-vermittelten Endorganschaden. Dabei schützte alleine die Adrenalectomie vor dem Angiotensin II-vermittelten Endorganschaden und eine zusätzliche Therapie mit dem Aldosteronsynthese-Hemmer FAD286 erbrachte in diesem Modell keinen zusätzlichen therapeutischen Nutzen.

Es bleibt noch offen, welche Bedeutung die erhöhte Expression der kardialen Aldosteronsynthese hat, zumal Aldosteron nicht der alleinige Ligand für den MR ist. Mit gleicher Affinität bindet Kortisol (bei Ratten Kortikosteron) an den MR und vermittelt abhängig vom exprimierenden Gewebe eine Stimulation (epitheliales Gewebe) oder eine Blockade (nicht-epitheliales Gewebe) des Rezeptors. Die lokale Konzentration von Kortisol wird von der Aktivität der 11 β HSD bestimmt, die Kortisol zu Kortison abbaut. Letzteres hat seine Affinität zum MR verloren (**Abb. 3**). Transgene Mäuse, welche die 11 β -HSD lokal in den Kardiomyozyten überexprimieren, entwickeln spontan Herzhypertrophie, Fibrose und Herzinsuffizienz. Die Behandlung mit Eplerenon verhindert diesen Phänotyp⁶¹. Diese Beobachtungen unterstreichen die schützende Wirkung von endogenen Glukokortikoiden vor der den MR aktivierenden Aldosteronbindung. Allerdings ist die 11 β HSD in Kardiomyozyten normalerweise nicht exprimiert, sodass Kortisol in 100-fach höherer Konzentration im Vergleich zu Aldosteron um die Bindung am MR konkurriert. Wenn in akuten oder chronischen Modellen der Herzinsuffizienz ein MR-Blocker trotzdem einen therapeutischen Vorteil erbringt, muss der MR unter bestimmten Umständen von einem aktivierenden Liganden besetzt sein. Es bedarf weiterer Studien, um die Aldosteron-Kortisol-MR-Achse besser verstehen zu lernen.

Während nicht geklärt ist, welcher Ligand am Herzen den MR besetzt, belegen klinische Studien den therapeutischen Nutzen der MR-Blockade. Hayashi et al. applizierten bei einem Teil der Patienten mit akuter Koronarischämie während der PTCA Spironolakton in die Koronararterien und konnten damit die linksventrikuläre Ejektionsfraktion langfristig signifikant verbessern⁶². RALES und EPHEsus zeigten den eindeutigen Überlebensvorteil bei denjenigen Patienten, deren Herzinsuffizienzbehandlung zusätzlich einen MR-Blocker enthielt^{1,63}. Bendtzen et al. wiesen bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis nach, dass Spironolakton die Synthese pro-entzündlicher Zytokine wie TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*), IL6 (Interleukin 6) und Osteopontin hemmt⁶⁴. Sato et al. beobachteten nach MR-Blockade weniger diabetische Proteinurie bei jenen Patienten, bei denen unter der Therapie mit einem Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmers nach initialer Suppression die Aldosteronspiegel wieder ansteigen (das sogenannte Aldosteron-*escape* oder *-breakthrough* Phänomen)⁶⁵. Die molekulare Grundlage des wieder ansteigenden Aldosteronspiegels ist nicht geklärt. In einer tierexperimentellen Arbeit diskutierten Naruse et al., dass der AT2R möglicherweise dieses *escape*-Phänomen vermittelt⁶⁶. Bestätigende und einen möglichen Mechanismus aufdeckende Arbeiten stehen jedoch noch aus. In diesem Kontext ist v.a. ungeklärt, warum sowohl unter Therapie mit einem Angiotensin-Konversions-Hemmer, der die Bildung des Liganden für den AT1- und AT2-Rezeptor blockiert, als auch unter Therapie mit einem AT1R-Blocker, bei dem Angiotensin II produziert werden und den AT2-Rezeptor besetzen kann, das Aldosteron-*escape*-Phänomen auftritt.