

Aus der Klinik für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin,
Charité Campus Mitte
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Androgen-abhängige Regulation von Steroidhormonrezeptoren
im Herz von Wistar-Ratten in Abhängigkeit von der
Salzaufnahme

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christopher Bartel

aus Frankfurt (Oder)

Datum der Promotion: 09.12.2016

„Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit.“

Albert Einstein

I) Inhaltsverzeichnis

I) Inhaltsverzeichnis	4
II) Abkürzungsverzeichnis	7
III) Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	10
1. Abstrakt.....	11
2. Einleitung.....	14
2.1 Geschlecht und das kardiovaskuläre System.....	14
2.2 Einfluss der Androgene auf das kardiovaskuläre System.....	15
2.2.1. Androgene und koronare Herzerkrankung	15
2.2.2. Androgene und arterielle Hypertonie.....	17
2.2.3. Androgene und Herzinsuffizienz.....	18
2.3 Das androgene System	21
2.4 Der Androgenrezeptor und dessen molekulare Wirkungsweise	22
2.5 Bedeutung von Mineralo- und Glukokortikoidrezeptoren im Herzen.....	25
2.6 Fragestellung.....	29
3. Materialien und Methoden	31
3.1. Materialien	31
3.1.1. Primer, Antikörper, Enzyme, Längenstandards.....	31
3.1.2. Chemikalien und Biochemikalien.....	32
3.1.3. Lösungen und Puffer	33
3.1.4. Kommerzielle Kits	35
3.1.5. Verbrauchsmaterialien.....	35
3.1.6. Geräte.....	36
3.1.7. Software.....	37
3.2. Methoden	38
3.2.1. <i>In vivo</i> -Tiermodell	38
3.2.2. RNA-Extraktion	39
3.2.3. RNA-Quantifizierung.....	40

3.2.4.	Überprüfung der RNA-Integrität.....	41
3.2.5.	Synthese der komplementären DNA (cDNA)	41
3.2.6.	Quantitative Real-Time PCR	42
3.2.7.	Auswertung und statistische Analyse der Real-Time PCR	44
3.2.8.	Proteinextraktion.....	45
3.2.9.	Proteinbestimmung nach Bradford.....	45
3.2.10.	Prinzip der SDS-PAGE und des Western Blots	45
3.2.11.	SDS-PAGE	46
3.2.12.	Immunoblot.....	46
3.2.13.	Quantifizierung und densitometrische Auswertung des Western Blots.....	47
3.2.14.	Statistische Analyse des Western Blots	48
4.	Ergebnisse	49
4.1.	Charakterisierung der Tiere.....	49
4.2.	mRNA Expression des Androgenrezeptors	51
4.3.	mRNA Expression des Mineralokortikoidrezeptors.....	52
4.3.1.	Hauptbehandlungsgruppen	52
4.3.2.	Effekte unter zusätzlicher Gabe von Flutamid und Spironolacton	53
4.4.	Expression von Transforming growth factor- β_1 und Serum glucocorticoid-induced kinase 1.....	55
4.5.	Proteinexpression des Mineralokortikoidrezeptors	57
4.6.	Expression des Glukokortikoidrezeptors und der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1	59
5.	Diskussion	61
5.1.	<i>In vivo</i> -Tiermodell und Androgenwirkungen	61
5.2.	Einfluss der nahrungsbedingten Salzzufuhr	62
5.3.	Autoregulation des Androgenrezeptors	64
5.4.	Charakterisierung der Androgen-abhängigen Regulation des Mineralokortikoidrezeptors und abhängiger Gene	65
5.4.1.	Androgen-abhängige Regulation des Mineralokortikoidrezeptors	65

5.4.2. Regulation von <i>Serum Glucocorticoid-induced kinase 1</i> und <i>Transforming growth factor-β_1</i>	67
5.5. Regulation des Glukokortikoidrezeptors	69
5.6. Mögliche zugrunde liegende Mechanismen und Interaktionen der regulierten Gene.....	70
5.7. Mögliche klinische Bedeutung der vorliegenden Arbeit	72
5.8. Limitationen der Arbeit.....	74
6. Literaturverzeichnis	76
7. Eidesstattliche Erklärung	90
8. Lebenslauf	91
9. Anteilserklärung an Publikationen.....	93
10. Danksagung.....	94

II) Abkürzungsverzeichnis

11 β -HSD	11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
AF	Activation Function
ANGII	Angiotensin II
AR	Androgenrezeptor
ARA	Androgenrezeptor-assoziiertes Protein
ARE	Androgen responsive element
ARKO	Androgenrezeptor-Knockout
AT ₂ -R	Angiotensin Typ 2-Rezeptoren
BSA	bovines Serumalbumin
CBG	Kortisol-bindendes Globulin
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CREB	Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding protein
CTGF	Connective tissue growth factor
DBD	DNA-bindende Domäne
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
eNOS	Endotheliale NO-Synthetase
ERK	Extracelluar-signal regulated kinase
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GR	Glukokortikoidrezeptor
HETE	Hydroxyeicosatetraenoidsäure

Abkürzungsverzeichnis

HP-90	Hitzeschock-Protein 90
ICAM	Intercellular adhesion molecule
KHK	Koronare Herzerkrankung
LBD	Liganden-bindende Domäne
LDL	Low density lipoprotein
LOX	Lectin-like ox-low density lipoprotein receptor
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MMTV	Mouse mammary tumor virus
MR	Mineralokortikoidrezeptor
mRNA	Messenger ribosomal ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NLS	Nuclear localisation signal
NTD	N-terminale regulatorische Domäne
NT-pro-BNP	N-terminal pro-brain natriuretic peptide
NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphate-buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	Reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Abkürzungsverzeichnis

SGK-1	Serum glucocorticoid-induced kinase 1
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
SHR	Spontane hypertensive Ratten
Sp1	Specifity protein 1
SRC	Steroidrezeptor Koaktivator
TGF- β_1	Transforming growth factor- β_1
TIMP	Tissue inhibitor of matrix-metalloprotease
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VSMC	Vascular smooth muscle cells

III) Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1:** Freies Testosteron im Serum (ng/ml) von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz
- Abbildung 2:** Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des Androgenrezeptors
- Abbildung 3:** Immunhistochemische Färbung des Mineralokortikoidrezeptors von Gewebe des linken Ventrikels (Kaninchen)
- Abbildung 4:** Schematischer Versuchsaufbau für die Hauptbehandlungsgruppe
- Abbildung 5:** Gesamtgewicht der Prostata von männlichen Wistar-Ratten unter natriumarmer Diät
- Abbildung 6:** Vielfache Veränderung der kardialen mRNA Expression des Androgenrezeptors in orchiektomierten männlichen Wistar-Ratten
- Abbildung 7:** Vielfache Veränderung der kardialen mRNA Expression des Mineralokortikoidrezeptors in orchiektomierten männlichen Wistar-Ratten
- Abbildung 8:** Vielfache Veränderung der kardialen mRNA Expression des Mineralokortikoidrezeptors in orchiektomierten männlichen Wistar-Ratten
- Abbildung 9:** Vielfache Veränderung der kardialen mRNA Expression des Mineralokortikoidrezeptors in orchiektomierten männlichen Wistar-Ratten unter zusätzlicher Injektion von 17,5 mg Spironolacton
- Abbildung 10:** Vielfache Veränderung der kardialen mRNA Expression des Mineralokortikoidrezeptors in orchiektomierten männlichen Wistar-Ratten unter zusätzlicher Injektion von Spironolacton beziehungsweise Flutamid
- Abbildung 11:** Vielfache Veränderung der kardialen mRNA Expression von TGF- β_1 in orchiektomierten männlichen Wistar-Ratten
- Abbildung 12:** Vielfache Veränderung der kardialen mRNA Expression von SGK-1 in orchiektomierten männlichen Wistar-Ratten
- Abbildung 13:** Vielfache Veränderung der kardialen Proteinexpression des Mineralokortikoidrezeptors in orchiektomierten männlichen Wistar-Ratten unter natriumarmer Behandlung und repräsentative Western Blots für MR und β -Actin
- Abbildung 14:** Vielfache Veränderung der kardialen mRNA Expression des Glukokortikoidrezeptors in orchiektomierten männlichen Wistar-Ratten
- Abbildung 15:** Repräsentative Western Blots mit kardialer Proteinexpression der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 in orchiektomierten männlichen Wistar-Ratten
- Abbildung 16:** Schematische Darstellung der möglichen Interaktion beteiligter Signalmoleküle bei Androgen-abhängiger Regulation des Mineralokortikoidrezeptors
- Tabelle 1:** Körpergewicht und Hormonspiegel männlicher Wistar-Ratten

1. Abstrakt

Einleitung: Geschlechtsunterschiede in Hinblick auf koronare Herzerkrankung, Herzinsuffizienz und arterielle Hypertonie legen eine modulierende Rolle von Androgenen auf das Herz-Kreislaufsystem nahe. Eine Blockade des Mineralokortikoidrezeptors (MR) senkt Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Herzinsuffizienz. Die Interaktion zwischen Androgenen und dem mineralokortikoiden System bleiben jedoch unklar. Die vorliegende Arbeit untersucht die Effekte von Androgenen auf die kardiale Expression des MR unter verschiedenen Aktivierungsgraden des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (salzarme vs. salzreiche Umgebung).

Methodik: Normotensive Wistar-Ratten im Alter von 8-10 Wochen wurden orchietomiert und anschließend für einen Zeitraum von insgesamt 5 Wochen einer natriumarmen bzw. natriumreichen Diät ausgesetzt. Es erfolgte innerhalb dieses Zeitraums eine Gabe von Testosteron, Dihydrotestosteron (DHT) oder Placebo als tägliche Subkutaninjektion für 16 Tage. Zusätzlich erhielten die Tiere den Androgenrezeptor (AR)-Antagonist Flutamid, den MR-Antagonist Spironolacton oder Placebo. Nach Tötung der Tiere erfolgte eine Analyse der Expression der mRNA für den MR, AR, Glukokortikoidrezeptor (GR) sowie für die MR-abhängigen Gene *Serum glucocorticoid-induced kinase 1* (SGK-1) und *Transforming growth factor- β_1* (TGF- β_1). Ebenfalls wurde eine Untersuchung der relativen Proteinexpression des MR durchgeführt.

Ergebnisse: Der kardiale mRNA-Gehalt des MR unter natriumreicher Diät entsprach 25,3 % des mRNA-Gehalts unter natriumarmer Behandlung ($p < 0,05$). Blockade des MR mit Spironolacton führte zu einer kompensatorischen Hochregulation der für den MR kodierenden mRNA. Androgene regulierten die mRNA Expression des MR der untersuchten Wistar-Ratten unter natriumrestriktiver Behandlung signifikant auf circa 20 % herunter. Da sich dieser Effekt durch Gabe von Flutamid blockieren ließ, scheinen AR-vermittelte Mechanismen involviert zu sein. Jedoch konnte eine Analyse der Proteinmenge des MR die Ergebnisse der mRNA Untersuchungen nicht bestätigen. Unter natriumreicher Diät führten Androgene zu keiner weiteren Senkung der mRNA Expression des MR. Inhibition des MR-Signalwegs in Form einer Androgen-vermittelten verminderten MR-Expression unter natriumarmer Diät schlug sich ebenfalls in einer verminderten Expression von SGK-1 nieder. TGF- β_1 wurde

durch eine natriumarme Behandlung auf 27,5% der Ausgangsmenge herunterreguliert. Androgene führten hier bei Wistar-Ratten unter natriumarmer Diät zu einer signifikanten Verminderung der Expression auf 20,5% (Testosteron) beziehungsweise 22,3% unter Gabe von DHT (jeweils $p < 0,05$). Keine Veränderung der AR Expression in Abhängigkeit der Salzaufnahme oder Androgenbehandlung konnte beobachtet werden. Unter natriumreicher Diät und DHT-Gabe kam es zu einer vermehrten Expression des GR.

Schlussfolgerung: Die vorliegende Arbeit zeigt Hinweise für eine mögliche Interaktion zwischen androgenem und mineralokortikoidem System im Herzen auf. Die Effekte zeigen sich hierbei abhängig von der Salzzufuhr. Androgene könnten so einen protektiven Effekt auf das Herz unter einer salzarmen Ernährung durch Suppression des mineralokortikoiden Signalwegs ausüben.

Introduction: Sex differences in cardiovascular disease, heart failure and hypertension suggest a modulating role of androgens in heart and vasculature. Blockade of the mineralocorticoid receptor (MR) lowers morbidity and mortality in patients with heart failure. However, the interactions between androgens and the mineralocorticoid system are unclear. This study aims at elucidating the effects of androgen treatment on cardiac MR expression in different states of activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (high vs. low salt load).

Methods: Normotensive male Wistar rats aged 8-10 weeks were orchietomized and put on low- or high-salt diet for 5 weeks. They were treated with testosterone, dihydrotestosterone (DHT) or placebo as daily subcutaneous injection for 16 days. In addition, the animals received the androgen receptor (AR) antagonist flutamide, the MR antagonist spironolactone or placebo, respectively. After sacrifice mRNA expression of MR, AR and glucocorticoid receptor (GR), as well as MR signaling targets SGK-1 and fibrosis marker TGF- β_1 were analyzed. Additionally, analysis of MR protein expression was performed.

Results: Cardiac MR mRNA was decreased in male rats on high-salt diet from 100% to 25.3% ($P < 0.05$). Blockade of MR by spironolactone led to a compensatory increase in MR mRNA expression. Androgens significantly downregulated MR mRNA expression in salt-deprived rats to about 20%. Since this effect was abolished by flutamide, AR-mediated mechanisms seem to be involved. However, analysis of MR protein levels could not confirm the results of mRNA studies. In salt-loaded animals, androgens were not able to decrease MR mRNA expression further. Inhibition of enhanced MR signaling by androgens in rats on low-salt diet was reflected by decreased SGK-1 mRNA expression. TGF- β_1 was suppressed in rats on a high-salt diet to 27.5%, and androgens significantly downregulated TGF- β_1 expression in salt-deprived animals to 20.5% (testosterone) and 22.3% (DHT) ($P < 0.05$). No change in AR expression in dependence of salt intake or androgen treatment was seen. Administration of DHT in animals under high-salt diet led to increased expression of GR mRNA.

Conclusion: The present study reveals significant crosstalk between androgen and mineralocorticoid signaling that involves MR and AR. Androgens may have a protective effect on the heart in a low-salt environment by suppressing mineralocorticoid action in this setting.

2. Einleitung

2.1 *Geschlecht und das kardiovaskuläre System*

Erkrankungen des Herzkreislaufsystems sind von enormer epidemiologischer Bedeutung und in westlichen Ländern Haupttodesursache. Trotz großer Fortschritte bei der Behandlung in hoch entwickelten Ländern werden Erkrankungen dieser Entität aufgrund des steigenden Altersdurchschnitts auch weiterhin entscheidenden Einfluss auf die Lebenserwartung haben.

Hierbei zeigt sich eine ausgesprochene Disparität zwischen den Geschlechtern in Hinblick auf das kardiovaskuläre System. So haben Männern im Vergleich zu Frauen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung (KHK), welches auch nicht als sekundärer Effekt etablierter Risikofaktoren erklärt werden kann [1, 2]. Bei klinischer Präsentation von Patienten mit akutem Koronarsyndrom zeigen Frauen in prospektiven Untersuchungen eine geringere Ausprägung der KHK in koronarangiographischen Untersuchungen [3]. Weiterhin konnte in einer randomisierten Studie bei Frauen bei akutem Myokardinfarkt eine größere Ischämietoleranz im Vergleich zu Männern nachgewiesen werden [4]. Auch in tierexperimentellen Studien können geschlechtsspezifische Unterschiede aufgezeigt werden. In diesem Zusammenhang konnte im Mausmodell bei Weibchen auch im Verlauf ein geringeres Risiko für Myokardinfarkt-assoziierte Komplikationen wie Re-Infarkte und Myokardrupturen demonstriert werden [5]. In gleicher Studie zeigte sich außerdem eine schlechtere linksventrikuläre Pumpfunktion und ungünstigeres kardiales Remodelling in männlichen Tieren. Auch in Bezug auf die Prävalenz und Prognose einer Herzinsuffizienz ergeben sich Geschlechterunterschiede. So konnte eine große Metaanalyse demonstrieren, dass Männer mit Herzinsuffizienz eine schlechtere Prognose gegenüber Frauen haben [6]. Diese Beispiele unterstreichen die Bedeutung von geschlechtsspezifischen Faktoren auf kardiovaskuläre Erkrankungen und führen zu Überlegungen, inwiefern das Geschlecht des Menschen einen Einfluss hierauf hat.

Als Ursache können sowohl genetische Erklärungsansätze als auch unterschiedliche Lebensweisen in Bezug auf das Risikoverhalten, aber auch die Wirkung von Sexualhormonen in Betracht gezogen werden. Hierbei lag der Forschungsschwerpunkt der letzten Jahre insbesondere auf der Wirkung weiblicher

Sexualhormone, welchen überwiegend eine protektive Rolle auf das kardiovaskuläre System zugeschrieben wurde [7-9]. Auf der anderen Seite ist der Einfluss von Androgen weitaus unklarer und das Überwiegen schädlicher oder protektiver Effekte ist Gegenstand reger wissenschaftlicher Diskussion.

2.2 Einfluss der Androgene auf das kardiovaskuläre System

2.2.1. Androgene und koronare Herzerkrankung

Androgene wirken über unterschiedliche Mechanismen auf das kardiovaskuläre System. Zentrale Stellung nimmt hierbei das Gefäßsystem mit der Entstehung von Atherosklerose und der klinischen Manifestation als KHK ein. Atherosklerose gilt hierbei als komplexer Prozess mit inflammativem Charakter, bei dem es zu endothelialer Dysfunktion mit nachfolgender Migration und Proliferation von Entzündungszellen und letztlich zur Ausbildung von Plaques innerhalb der arteriellen Gefäßwand kommt [10].

Um die zuvor beschriebenen Phänomene in der geschlechtsspezifischen Prävalenz von KHK und Atherosklerose teilweise zu erklären, wurde in zahlreichen Tiermodellen die Wirkung von Androgenen untersucht. Die genauen Mechanismen, über die diese Effekte vermittelt werden, sind noch unvollständig verstanden. So scheinen Androgene direkten Einfluss auf den Prozess der Atherosklerose zu nehmen. Dieser involviert nach aktueller Auffassung verschiedene Zellarten wie Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Makrophagen und deren Interaktion innerhalb der Intima und der Media der Gefäßwand. Ein früher Schritt bei der Entstehung von atherosklerotischen Veränderungen ist die Adhärenz von Monozyten an das Endothel, wobei *Vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) eine entscheidende Rolle spielt.

Protektive Effekte von Androgenen auf den Prozess der Atherosklerose sind in diesem Zusammenhang beschrieben. So zeigt sich in einem Atherosklerosemodell von männlichen Kaninchen, welche cholesterinreich ernährt wurden, eine antiatherosklerotische Wirkung von Testosteron und dem Androgenvorläufer Dehydroepiandrosteron (DHEA) [11, 12]. Dieser Effekt scheint dabei unabhängig von Plasmacholesterol zu sein und über lokale Aromatisierung von Androgenen zu Estrogenen zu wirken [13]. Jedoch gibt es auch Hinweise auf eine atheroprotektive Wirkung an der Gefäßwand, welche zumindest partiell über den Androgenrezeptor

(AR) vermittelt wird [14]. So zeigt sich beispielsweise eine inhibitorische Wirkung von DHT auf die Expression von *Lectin-like ox-low density lipoprotein receptor-1* (LOX-1), welcher bei der Ausbildung von Schaumzellen und der Entstehung der endothelialen Dysfunktion von Bedeutung ist [15]. Testosteron vermindert über Aromatisierung zu Estradiol die Expression des Adhärenzmoleküls VCAM-1 und könnte so ebenfalls atheroprotektive Effekte *in vitro* entfalten [16]. Androgene wirken auch als vasoaktive Hormone und sind in der Lage, nach unmittelbarer Gabe in Männern mit bekannter KHK vasodilatative Effekte auszulösen [17, 18]. Dies scheint an hohe Dosen und rasch verfügbare Applikationsformen gebunden zu sein, da eine Studie mit transdermaler Langzeitsupplementierung keinen Einfluss auf endothelvermittelte Vasodilatation zeigte [19].

Andererseits sind auch proatherogene Wirkungen von Androgenen beschrieben. In Zellkulturexperimenten führte das nicht-aromatisierbare Dihydrotestosteron (DHT) zu einer Stimulation der Expression von VCAM-1. Auf die glatten Muskelzellen der Gefäßwand scheinen Androgene einen stimulierenden Einfluss hinsichtlich Migration und Proliferation zu haben und könnten so die Entstehung atherosklerotischer Plaques ebenfalls begünstigen [20]. Makrophagen und deren Vorläufer Monozyten spielen eine entscheidende Rolle im Prozess der Atheroskleroseentstehung durch Internalisierung von oxidierten *Low density lipoprotein* (LDL)-Partikeln und der Ausbildung von Schaumzellen. Bei Stimulation mit DHT konnte in Makrophagen eine Hochregulation von Genen, die in Verbindung mit der Entwicklung von Atherosklerose stehen, zusammen mit einer funktionellen Steigerung der lysosomalen Degradierung von LDL-Partikeln demonstriert werden [21].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Wirkung von Androgenen auf die Entstehung und das Fortschreiten einer KHK immer noch lückenhaft erforscht ist und durch die potentielle Konversion von Testosteron zu 17 β -Estradiol, aber auch zu DHT komplexe Betrachtungsweisen erfordert. In klinischen Studien konnten sowohl schädliche als auch günstige Wirkungen von Testosteron auf kardiovaskuläre Risikofaktoren und die vaskuläre Funktion demonstriert werden [22-24]. Klinische Bedeutung erlangt dies insbesondere für die Testosterongabe sowie deren Potentiale und Risiken bei hypogonadalen Männern, auch wenn hierbei prinzipiell eine Substitution auf physiologische Testosteronspiegel angestrebt wird.

2.2.2. Androgene und arterielle Hypertonie

Mit Beginn der Pubertät besitzen männliche Jugendliche einen im Vergleich zu weiblichen Gleichaltrigen höheren arteriellen Blutdruck. Dieser Unterschied bleibt bis zur Menopause der Frauen bestehen [25, 26]. Bei Erkrankungen von Frauen, die mit erhöhten Androgenspiegeln einhergehen wie dem polyzystischen ovariellen Syndrom, konnten erhöhte Blutdruckwerte nachgewiesen werden, was eine pathophysiologische Beteiligung männlicher Sexualhormone suggeriert [27]. In zahlreichen Tiermodellen zur arteriellen Hypertonie in Ratten zeigten männliche Tiere stets höhere Blutdruckwerte als Weibchen [28-30]. Dieser Effekt scheint dabei über den AR vermittelt zu sein und keine Aromatisierung zu Estradiol zu erfordern [31]. Die Blutdruckerhöhung ist hierbei durch Orchiektomie oder pharmakologische Blockade des AR reversibel [32]. Auf der anderen Seite scheint im Tiermodell eine Ovariektomie von spontanen hypertensiven Ratten (SHR) keinen Einfluss auf den arteriellen Blutdruck in Weibchen zu nehmen [28].

Verschiedene Mechanismen, wie Androgene den Blutdruck beeinflussen und eine arterielle Hypertonie begünstigen, wurden beschrieben. Zunächst scheinen im Rattenmodell Androgene die zentrale Blutdruckregulation in postnatalen und adoleszenten Entwicklungsstufen der Männchen zu prägen [33, 34]. Über direkte hypertrophe Effekte auf das Herz lassen sich durch Erhöhung von Kontraktilität und Schlagvolumen auch blutdrucksteigernde Effekte ableiten [35-37]. Darüber hinaus wird auch eine Beteiligung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) diskutiert [38]. Hierbei scheint Testosteron über Stimulation der Expression von Angiotensinogen zu einer gesteigerten Renin-Plasmaaktivität und somit folglich zu einer Zunahme des systemischen Blutdrucks und Abnahme der renalen Natrium-Exkretion zu führen [39]. Insbesondere für eine Salz-induzierte Hypertonie in männlichen Tieren scheint dieser Effekt von Bedeutung zu sein [30, 40]. Dass Testosteron zu einer verminderten Ausscheidung von Natrium als bedeutendes Elektrolyt für das intravasale Volumen führt, konnte auch in normotensiven Wistar-Ratten demonstriert werden [41]. Grundlage hierfür könnte die Androgen-abhängige Expression der α -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals (ENaC) der Niere sein, dessen direkte Regulation durch Testosteron *in vivo* und *in vitro* verifiziert wurde [42]. Dieser Mechanismus scheint jedoch nur die Nieren männlicher Tiere zu betreffen, da in Weibchen diese Regulation nicht nachgewiesen werden konnte [43]. Direkt an Gefäßen führt DHT über Stimulation von Cytochrom-P450 4A zu einer vermehrten

Produktion von 20-Hydroxyeicosatetraenoidsäure (20-HETE) [44]. Für eine pathophysiologische Beteiligung dieses Arachidonsäurederivats spricht, dass eine CYP4A-Blockade mit nachfolgend niedrigen 20-HETE-Spiegeln in gleicher Arbeit auch die blutdrucksteigernde Wirkung von DHT aufhob. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen, über welche 20-HETE den Gefäßtonus erhöht, sind noch nicht abschließend aufgedeckt. Eine Beeinflussung der Aktivierung der endothelialen NO-Synthetase (eNOS) über die Produktion radikaler Sauerstoffspezies oder Inhibierung des kalziumabhängigen Kaliumkanals auf glatten Gefäßwandzellen wurden postuliert [44, 45].

2.2.3. Androgene und Herzinsuffizienz

Auch auf Prozesse wie Hypertrophie und Herzinsuffizienz scheinen Androgene Einfluss zu nehmen. Mit Einsetzen der Pubertät entwickeln männliche Jugendliche einen größeren linken Ventrikel im Vergleich zu weiblichen Altersgenossen [46]. Männliche Sexualhormone haben einen Einfluss auf das Gesamtgewicht des Herzens, vermitteln eine gesteigerte kardiale Funktion und beeinflussen die Expression kontraktiver Proteine [47]. Der AR zeigt hierbei Expression in Kardiomyozyten, was auch direkt vermittelte Effekte denkbar erscheinen lässt [37]. Auch die Kontraktilität des Herzens wird im Rattenmodell sowie *in vitro* durch physiologische Dosen von Testosteron gesteigert, was über zelluläre Transporter, welche die intrazelluläre Kalziumkonzentration steuern, vermittelt zu sein scheint [35, 36].

In der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz sind adaptive Prozesse wie die erwähnte kardiale Hypertrophie und die Steigerung der Kontraktilität wichtige Kompensationsmechanismen in frühen Erkrankungsstadien. Herzinsuffizienz ist gekennzeichnet durch ein unzureichendes Herzminutenvolumen bei normalem enddiastolischem Ventrikeldruck. Durch Aktivierung des RAAS und gesteigertem Sympathikotonus kommt es daraufhin längerfristig zu maladaptiven Anpassungsprozessen, die Form und Struktur des Herzens betreffen. Diese werden unter dem Begriff Remodelling zusammengefasst und umfassen Prozesse wie Hypertrophie und Fibrose. Chronische Herzinsuffizienz bleibt jedoch nicht nur auf das Organ selbst beschränkt, sondern nimmt auch Einfluss auf die Skelettmuskulatur, den Metabolismus und nicht zuletzt auch auf das endokrine System. So konnten in einer Längsschnittstudie erniedrigte Spiegel an Testosteron in Patienten mit

chronischer Herzinsuffizienz im Vergleich zu gesunden, altersentsprechenden Kontrollen gefunden werden [48]. Testosteron war hierbei auch mit dem klinischen Ausprägungsgrad der Herzinsuffizienz, widergespiegelt anhand der *New York Heart Association* (NYHA) – Klassifikation, korreliert (Abbildung 1) und war unabhängig von etablierten Risikofaktoren mit einer schlechteren Prognose assoziiert [48]. Die erhöhte Prävalenz von niedrigen Spiegeln an freiem Testosteron bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz konnte auch in anderen Studien gezeigt werden, wobei deren Einfluss auf die Mortalität nach Adjustierung in Hinblick auf Störvariablen wie Hypertonie oder Vorhofflimmern nicht mehr nachweisbar war [49, 50].

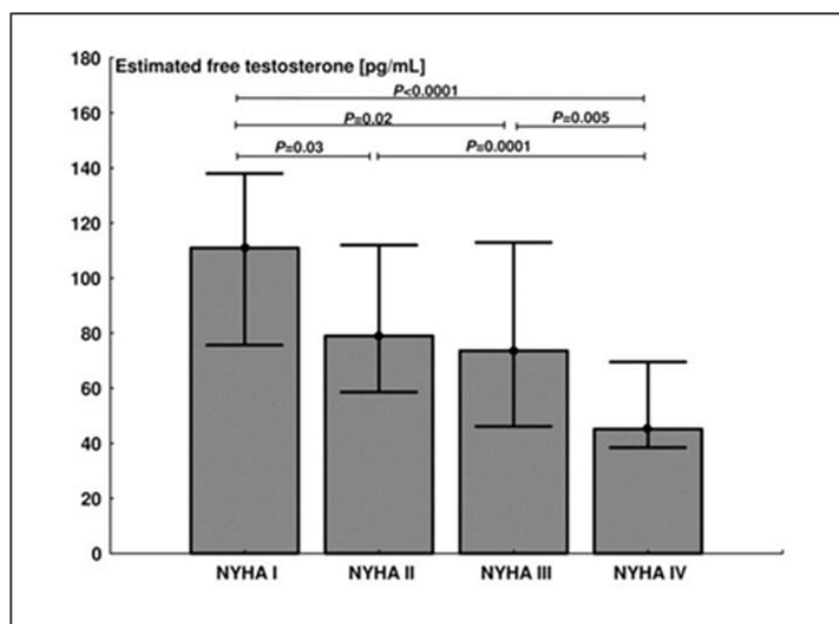


Abbildung 1: Freies Testosteron im Serum (ng/ml) mit Median sowie oberer und unterer Quartile von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz in Stadium I-IV gemäß der New York Heart Association-Klassifikation. Jankowska et. al [48].

Dies zeigt, dass die direkte pathophysiologische Bedeutung von Androgenen in Zusammenhang mit der Herzinsuffizienz umstritten ist und von einer Reihe von Autoren angenommen wird, dass die hohe Prävalenz von hypogonadalen Männern mit Herzinsuffizienz eher Ausdruck des chronisch beeinträchtigten Allgemeinzustandes mit kataboler Stoffwechsellage und Kachexie ist [51]. In klinischen Studien hingegen konnte eine Testosterongabe in physiologischen Dosen sowohl bei eugonadalen als auch hypogonadalen Patienten mit Herzinsuffizienz eine Reihe von positiven Effekten hervorrufen. So konnte eine Verbesserung der

Leistungsfähigkeit im Gehstest, eine gesteigerte maximale Sauerstoffaufnahme (VO_{2max}) sowie eine verbesserte maximale Kraftentwicklung der peripheren Skelettmuskulatur nachgewiesen werden [52-54]. Auch Metaanalysen der bisher durchgeführten klinischen Studien konnten diese Ergebnisse validieren und die Sicherheit der Testosterongabe für Patienten mit Herzinsuffizienz ohne ein gehäuftes Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse in den Behandlungsgruppen demonstrieren [55, 56]. Auf der anderen Seite konnte in fast keiner der Studien ein Einfluss von Testosteron auf Parameter wie der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) oder dem N-terminalen pro-brain natriuretic peptide (NT-pro-BNP) gezeigt werden. Dies suggeriert, dass es sich eher um periphere Effekte ohne Verbesserung der kardialen Funktion zu handeln scheint, deren prognostische Bedeutung fraglich bleibt.

Auch Tiermodelle wurden für die Frage nach direkten Effekten von Androgenen im Herzen herangezogen. In einem Rattenmodell zur Herzinsuffizienz konnte gezeigt werden, dass Orchiektomie zu echokardiographischen Veränderungen mit Verschlechterung der myokardialen Leistung führte und Testosterongabe diese Veränderungen aufheben konnte [57]. Auch histopathologische Korrelate wie Apoptose und myokardiale Fibrose konnten in gleicher Arbeit durch Testosterongabe gesenkt werden. Als zugrunde liegender Mechanismus wurde hierbei eine veränderte Expression kardialer beta-Rezeptoren diskutiert, die auf diesem Wege kardioprotektive Effekte von Testosteron vermitteln. Ein weiteres Rattenmodell für Herzinsuffizienz konnte ebenfalls günstige Effekte einer Testosteron-Substitution auf Fibrose und zelluläre Apoptose zeigen, welche mit einer Herunterregulation von kardialen Angiotensin Typ 2-Rezeptoren (AT_2 -R) einher gingen [58]. Auch hier war die durch Kastration beobachtete Verschlechterung der linksventrikulären Funktion durch Androgengabe reversibel. Zur Untersuchung der physiologischen Funktion des AR und seiner Funktion *in vivo* dienen Androgenrezeptor-Knockout (ARKO)-Mäuse, in denen die Expression des Rezeptors ausgeschaltet wurde. In diesen Mäusen wurden veränderte Anpassungsprozesse bei Angiotensin II (ANGII)-Infusionen beobachtet, welche initiale Schritte bei der Herzinsuffizienz bedingt durch arterielle Hypertonie modellhaft imitieren sollen [59]. Beim Wildtyp mit intaktem androgenem System trat eine konzentrische Hypertrophie mit begleitender Fibrose auf, das Fehlen des AR führte hingegen zu reduzierter Ventrikelmasse mit ventrikulärer Dysfunktion und Neigung zu ausgeprägter Fibrose. Diese maladaptive Antwort auf ANGIIL scheint zumindest teilweise durch eine Androgen-abhängige intrazelluläre

Signaltransduktion mit verminderter Phosphorylierung von *Extracellular-signal regulated kinase* (ERK) 1/2 sowie 5 vermittelt zu sein. Dies suggeriert eine protektive Wirkung von Androgenen bei ANGII-induzierter kardialer Fibrose.

2.3 Das androgene System

Androgene sind Steroidhormone, deren bedeutendste Funktionen in der Ausbildung des männlichen Phänotyps während der Embryogenese und der Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale während der Pubertät liegen. Doch auch in den darauffolgenden Lebensabschnitten sind Androgene wichtig für die sexuelle Funktion und Spermatogenese, psychisches Verhalten, Knochenmetabolismus und Stoffwechsel. Wichtigste Vertreter sind Testosteron und DHT, welches mit Hilfe der 5 α -Reduktase aus Testosteron konvertiert werden kann [60]. Testosteron selbst wird in den Leydig-Zellen des Hodens gebildet. Daneben existieren Androgene, welche hauptsächlich in der Nebennierenrinde gebildet werden: DHEA und Androstendion. Obwohl alle Androgene ihre Wirkung über den AR entfalten, wirken die zwei Hauptandrogene Testosteron und DHT unterschiedlich. Während Testosteron vor allem Libido, Sexualfunktion und Muskelwachstum steuert, ist DHT für die Embryogenese der männlichen Geschlechtsorgane, sowie für Körper- und Kopfbehaarung von entscheidender Bedeutung [61]. Testosteron sollte aus diesem Grund nicht allein als Vorläufer von DHT verstanden werden.

Testosteron kann im Gegensatz zu DHT durch Aromatase zu Estradiol umgewandelt werden, wodurch Effekte von Testosteron indirekt auch durch Stimulation von Estrogenrezeptoren vermittelt werden können [62]. Sowohl Aromatase, als auch 5 α -Reduktase werden im Herz exprimiert und können so Testosteron lokal umwandeln [63]. DHT zeigt eine circa 10-fach höhere Aktivierung von MMTV-Promotor-Konstrukten in *Chinese Hamster Ovary*-Zellen, was in einer höheren Affinität zum AR begründet ist [64].

Flutamid wirkt als spezifischer Antagonist am AR, was von klinischer Bedeutung beispielsweise bei der Behandlung des metastasierten Prostatakarzinoms ist.

2.4 Der Androgenrezeptor und dessen molekulare Wirkungsweise

Der AR ist ein Protein, welches zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren gehört. Hierbei handelt es sich um Strukturen, die unter Bindung des jeweiligen Liganden als Transkriptionsfaktoren fungieren können und somit Einfluss auf die Expression entsprechender Zielgene nehmen können. Der Androgenrezeptor gehört zusammen mit dem Estrogenrezeptor, dem Progesteronrezeptor, dem Glukokortikoidrezeptor sowie dem Mineralokortikoidrezeptor der Subklasse I an. Diese zeichnet sich durch die Ausbildung von Homodimeren unter Ligandenbindung aus, welche für die Bindung an die DNA benötigt wird. Die DNA-Bindungsmotive sind hierbei als *Inverted repeats* arrangiert und stehen sich in ihrer Sequenz praktisch spiegelbildlich gegenüber.

Der AR kann in vier verschiedene funktionelle Domänen eingeteilt werden (siehe Abbildung 2): die N-terminale regulatorische Domäne (NTD), die DNA-bindende Domäne (DBD), die *Hinge*-Region sowie die Liganden-bindende Domäne (LBD).

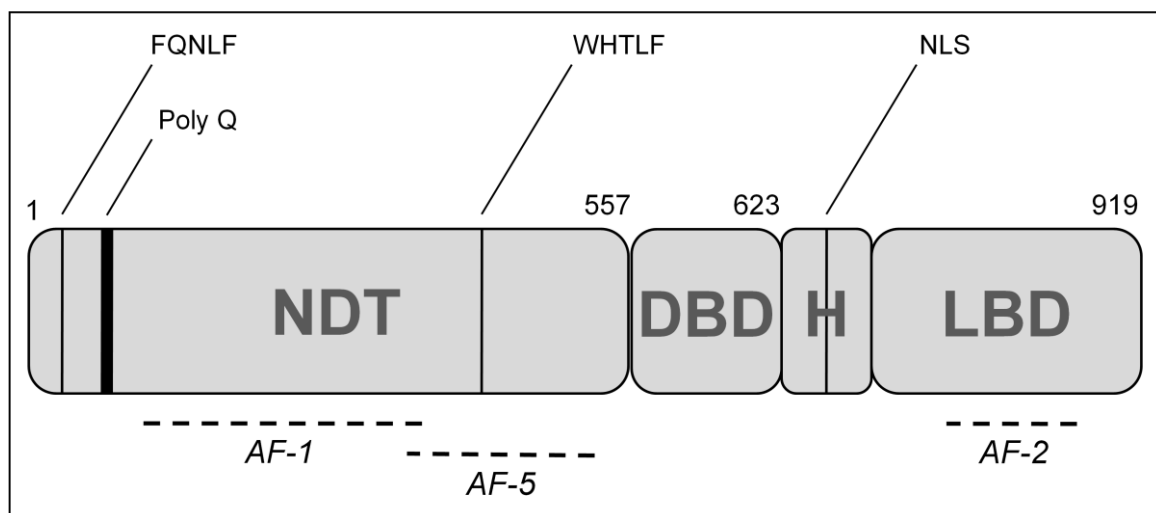


Abbildung 2: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des Androgenrezeptors mit Angabe der Aminosäureposition. N-terminale regulatorische Domäne (NTD) mit *Activation function* (AF) 1 und 5 als Interaktionsstellen zu Kofaktoren sowie der C-terminalen Region; Poly-Glutamin Kette mit variabler Größe (Poly Q); FQNLF und WHTLF als Interaktionsmotive mit der C-terminalen Region. DBH – DNA-bindende Domäne. H – *Hinge*-Region mit *Nuclear localisation signal* (NLS). Liganden-bindende Domäne (LBD) mit AF-2. Modifiziert nach Wijngaart et. al [65].

Die NTD ist für die transkriptionelle Funktion des Rezeptors entscheidend und trägt zwei Sequenzabschnitte, die von besonderer Bedeutung sind. Sie werden als

Activation function (AF) 1 und 5 bezeichnet, wobei sich zusätzlich ein AF-2 in der LBD befindet. Darüber hinaus enthält die NTD eine Polyglutaminsequenz beginnend mit Aminosäure (AS) 57, deren Länge variabel ist [66]. Klinische Bedeutung erhält dies für die Pathogenese des Kennedy-Syndroms, einer neuromuskulären degenerativen Erkrankung, bei der es zu einer Trinukleotid-Expansion mit Verlängerung der Polyglutaminsequenz kommt [67]. Doch auch eine verkürzte Länge der Sequenz könnte pathologische Bedeutung in Hinblick auf ein möglicherweise erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Prostatakarzinomen haben [68].

Im Gegensatz zur NTD zeigt die DBD ein hohes Maß an Sequenzhomologie mit den anderen Vertretern der Subfamilie vom Typ I. Sie ist rund 80 AS lang und enthält zwei Zinkfinger-Domänen. Diese treten in Wechselwirkung mit spezifischen Bindungsmotiven in der großen Furche der DNA-Helix und sind für die DNA-abhängige Dimerisation von entscheidender Bedeutung [66, 69].

Zwischen DNA- und Liganden-bindender Domäne befindet sich eine als *Hinge*- oder Gelenks-Region bezeichneter Rezeptorabschnitt, der wichtig für die Translokation in den Zellkern ist und wichtige Aminosäurereste für die posttranslationale Modifikation des Rezeptors enthält. Die *Hinge*-Region enthält ein *Nuclear localisation signal* (NLS), welches nach Liganden-induzierter Konformationsänderung den Rezeptorkomplex durch Bindung an α -Importin in den Zellkern transportiert [70].

Die LBD enthält die für die Funktion des AR entscheidende zentrale Bindungstasche, welche spezifisch und hochaffin für Androgene ist [71, 72]. Mutationen in diesem Bereich wurden sowohl bei kompletter als auch partieller Androgenresistenz sowie in Prostatakarzinomen gefunden [73, 74]. Die LBD beinhaltet außerdem die Transaktivierungseinheit AF-2, welche wie die AF-1 Liganden-abhängige Aktivität zeigt [75]. Im Vergleich zu anderen Steroidhormonrezeptoren ist der potentielle Grad der Transaktivierung durch die AF-2 jedoch gering und AF-1 und AF-5 vermitteln im AR die Hauptaktivität [76, 77]. Allerdings ist die AF-2 für eine besondere intramolekulare Interaktion mit der NTD von besonderer Bedeutung.

In Abwesenheit eines Liganden ist der AR in erster Linie zytosolisch verteilt und in einem Multi-Proteinkomplex aus Hitzeschock-Protein 90 (HP-90) und anderen Ko-Chaperonen gebunden, die den Rezeptor in seiner inaktiven Form halten [78]. Das im Blut zirkulierende Testosteron, welches nicht an Sexualhormon-bindendem Globulin (SHBG) oder Kortisol-bindendem Globulin (CBG) gebunden ist, kann als freies Hormon die Zellmembran durch Diffusion überwinden und so mit dem AR in

Interaktion treten. Entgegen dieser „freien Hormon-Hypothese“ gibt es jedoch auch Hinweise für eine Megalin-vermittelte Endozytose von an SHBG-gebundenem Testosteron [79]. Bei Bindung eines Liganden an den AR kommt es nun zur Änderung der Konformation und Phosphorylierung des Rezeptors sowie nachfolgendem Transport in den Nukleolus [80, 81]. Daraufhin erfolgt unter Bindung an die DNA die Ausbildung von Homodimeren und anschließend die essentielle Rekrutierung von Kofaktoren. Diese führen letztlich zur Formung eines Transkriptionskomplexes und zur Amplifikation des jeweiligen Zielgens mittels RNA-Polymerase II. Hierbei ist zu erwähnen, dass die überwiegende Zahl der Androgen-regulierten Gene über diesen Weg eine Hochregulation des jeweiligen Proteins erfährt. Jedoch ist für eine Vielzahl von Genen auch eine Expressionshemmung beschrieben. Verschiedene Mechanismen hierzu sind bekannt, so beispielweise eine Protein-Protein-Interaktion des AR mit dem Transkriptionsfaktor *Specificity protein 1* (Sp1), welcher üblicherweise an die distale Promotorenregion des Gens für die β -Untereinheit des luteinisierenden Hormons bindet [82]. Auch eine direkte Inhibition durch Rekrutierung von Ko-Repressoren mit Ausbildung eines Repressionskomplexes ist für Cyclin D1 in BrCA-Zellen beschrieben [83].

Homodimere des Glukokortikoid-, Progesteron-, Mineralokortikoid- und Androgenrezeptors erkennen allesamt die identische palindromische DNA-Sequenz AGAACAnnnTGTTCT [84, 85]. Diese ist wie bereits erwähnt als umgekehrte Wiederholung (*Inverted repeats*) arrangiert und befinden sich innerhalb der Promotoren eines Gens.

Hieraus ergibt sich die Frage, wie die unterschiedlichen Steroidhormonrezeptoren der Klasse I jeweils spezifische Wirkung entfalten und unterschiedliche Gene regulieren, wenn diese an identische DNA-Motive binden. Hierbei kann beispielsweise die Expression der Rezeptoren selbst Zellspezifität vermitteln. Während der GR in fast allen Geweben exprimiert wird, zeigt der AR nur in einigen Organen signifikante Expression wie beispielsweise Prostata, Hoden, Herz, Niere oder Haarfollikeln [86]. Des Weiteren sind die Kofaktoren von entscheidender Bedeutung. Nur die Formung eines Multi-Protein-Komplexes gemeinsam mit Kofaktoren führt auch zu regulatorischen Konsequenzen nach erfolgter DNA-Bindung. Kofaktoren unterstützen die Transaktivierung durch den AR und können hierbei in drei Gruppen eingeteilt werden: Die erste Gruppe umfasst hierbei Proteine, welche die Interaktion mit der DNA stabilisieren, den Zustand der Chromatinstruktur

modulieren oder allgemeine Transkriptionsfaktoren wie die RNA Polymerase II rekrutieren [87]. Hierzu gehören beispielsweise *cAMP response element binding protein* (CREB)/p300 und *Steroid receptor coactivator* (SRC)-1. Beide besitzen Histon-Acyltransferase-Aktivität und können somit die DNA in eine transkriptionell aktive Form überführen [88, 89]. Eine zweite Gruppe von Kofaktoren hat die Funktion, Kontakt zwischen AR, den allgemeinen Transkriptionsfaktoren der Zelle sowie der RNA-Polymerase II herzustellen. Hierzu zählt beispielweise der Mediator Komplex (MED). Zusätzlich gibt es Kofaktoren, welche die Konformation des AR selbst beeinflussen und so Einfluss auf das Ausmaß der Transkription nehmen. Hierbei sei exemplarisch das Androgenrezeptor assoziierte Protein (ARA) 70 genannt [90].

Der AR weist in Hinblick auf die spezifische Wirkung eine weitere Besonderheit unter den Mitgliedern seiner Subfamilie der nukleären Rezeptoren auf. Neben der genannten klassischen palindromischen Sequenz, welche auch als *Androgen responsive elements* (ARE) bezeichnet werden, kann der AR auch exklusiv an DNA-Abschnitte binden, welche von diesem Muster abweichen. Diese abweichenden responsiven Elemente, welche auch als selektive ARE bezeichnet werden, konnten unter anderem für das Probasin-Gen und dem Gen für die sekretorische Komponente des Immunglobulins der Klasse A und M demonstriert werden [91-93]. Hierbei ist das 5'-TGTTCT-3'-Palindrom als direkte Wiederholung angeordnet [94]. Selektive ARE stellen somit DNA-Elemente dar, an denen ausschließlich der AR binden kann und so zu einer Androgen-spezifischen Wirkung führt.

2.5 Bedeutung von Mineralo- und Glukokortikoidrezeptoren im Herzen

In klassischen Zielgeweben wie Niere, Kolon oder den Speicheldrüsen ist der physiologische Ligand des MR das Steroidhormon Aldosteron. Hierbei ist Aldosteron an der Regulation des extrazellulären Volumens sowie an der renalen Natriumreabsorption und Kaliumexkretion beteiligt [95]. Eine Besonderheit ist, dass Glukokortikoide wie Kortisol oder Kortikosteron mit vergleichbarer Affinität sowohl an den GR als auch an den MR binden können. In klassischen Zielzellen epithelialer Herkunft wie dem distalen Tubulus der Niere metabolisiert das Enzym 11 β -

Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11 β -HSD) Typ 2 Glukokortikoide zu inaktiven Metaboliten und stellt so eine spezifische Wirkung von Aldosteron am MR sicher [96]. Der MR wird jedoch auch in nicht-epithelialen Geweben wie dem Herz exprimiert (Abbildung 3). Intrakardial wird überwiegend die 11 β -HSD vom Typ 1 exprimiert, welche die intrazelluläre Bildung von aktiven Glukokortikoiden katalysiert [97]. Aufgrund der vielfach höheren Serumkonzentration an Glukokortikoiden (ca. 1000-fach) kann daher davon ausgegangen werden, dass unter normalen Umständen der MR durch Kortisol besetzt ist, welches überwiegend eine antagonistische Wirkung entfaltet [98]. Somit kann unter physiologischen Bedingungen Kortisol und nicht Aldosteron als Hauptligand für den kardialen MR betrachtet werden.



Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung des Mineralokortikoidrezeptors von Gewebe des linken Ventrikels (Kaninchen), Vergrößerung 202,5x; m: Kardiomyozyt, Lombes et al [99].

Unter vermehrtem oxidativen Stress oder inadäquatem Aldosteron-Exzess wird der MR jedoch durch seinen spezifischen Liganden Aldosteron aktiviert und entfaltet ungünstige Effekte mit Entstehung von linksventrikulärer Dysfunktion und Herzinsuffizienz [98, 100]. Zusätzlich zu diesen Effekten ist für den MR eine pathophysiologische Bedeutung in Zusammenhang mit der Entstehung von kardialer Fibrose und Inflammation in zahlreichen Arbeiten aufgezeigt worden. Interessanterweise scheint hierbei die Wirkung des aktivierten MR von der nahrungsbedingten Salzaufnahme abhängig zu sein und nur unter hoher Salzzufuhr aufzutreten [101]. Hierbei führt der inadäquate Aldosteron-Exzess, wie er bei einem

primären Hyperaldosteronismus auftritt, zu arterieller Hypertonie, Linksherzhypertrophie sowie myokardialer Fibrose. Die Effekte werden in diesem Zusammenhang über den MR vermittelt und scheinen keine indirekte Folge der begleitenden Hypertonie zu sein. Auch in klinischen Studien schien das Auftreten der Linksherzhypertrophie bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus mit der Salzaufnahme zu korrelieren [102]. Zu sekundär erhöhten Spiegel an Aldosteron kommt es auch im Rahmen einer Herzinsuffizienz mit Aktivierung des RAAS. Große klinische Studien konnten den enormen prognostischen Nutzen einer pharmakologischen Blockade des MR bei Patienten mit symptomatischer Herzinsuffizienz oder nach Myokardinfarkt mit eingeschränkter linksventrikulärer Funktion demonstrieren [103, 104].

Die zugrunde liegenden Pathomechanismen einer MR-Aktivierung im Rahmen kardialer Erkrankungen sind auf molekularer Ebene bisher unvollständig verstanden. Grundlage ist die Expression des MR in Kardiomyozyten, Endothelzellen und *Vascular smooth muscle cells* (VSMC). Für kardiale Fibroblasten hingegen zeigen sich widersprüchliche Ergebnisse. In Tiermodellen entwickelte sich nach einer vierwöchigen Gabe von Aldosteron eine vermehrte Expression von proinflammatorischen Proteinen wie *Intercellular adhesion molecule* (ICAM) -1, *Monocyte chemoattractant protein* (MCP) -1 und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) zusammen mit erhöhtem Kollagengehalt und Makrophagen- sowie Lymphozyteninfiltration im Herz von Ratten [105]. Aldosteron scheint auch über eine Reihe anderer Chemokine zu wirken und zu einer vermehrten Expression von *Tissue inhibitor of matrix-metalloprotease* (TIMP) -2 und *Connective tissue growth factor* (CTGF) zu führen [106]. Zugrunde liegend könnte ein Auftreten von vermehrtem oxidativen Stress über die Bildung *Reactive oxygen species* (ROS) sein. Weiterhin gibt es Hinweise für eine Aldosteron-induzierte vaskuläre Dysfunktion unter Einbeziehung von Endothelin-1 sowie der lokalen NO-Produktion [107, 108].

Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) ist hierbei ein weiteres profibrotisch wirkendes Protein, welches bei Stimulation des MR vermehrt gebildet wird und vor allem eine parakrine Wirkung im Herzen in Hinblick auf Hypertrophie und Fibrose ausübt [106, 109]. Interessanterweise konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die beschriebenen proinflammatorischen und profibrotischen Veränderungen auch mit einer MR-vermittelten Induktion von *Serum glucocorticoid-induced kinase 1* (SGK-1) einhergingen [106]. Klassischerweise steigert diese Kinase in Zielzellen epithelialer

Herkunft den intrazellulären Natrium-Influx über Aktivierung von Natrium-Austauschern und Kaliumkanälen. In einem Mausmodell zur Herzinsuffizienz zeigte sich eine protektive Wirkung in Bezug auf die Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie und das Auftreten einer kardialen Fibrose nach funktioneller Ausschaltung des SGK-1-Gens [110]. Dies könnte zum Teil in kausalem Zusammenhang mit elektrophysiologischen Veränderungen im Natriumeinstrom durch Interaktion von SGK-1 mit dem myokardialen Natriumkanal Nav1.5 stehen [110]. Ebenfalls zeigt sich in einem weiteren Mausmodell mit experimenteller Vorlasterrhöhung eine SGK-1-abhängige Regulation des kardialen Na^+/H^+ -Austauschers NHE1. Dieser Mechanismus scheint über eine Änderung des intrazellulären pH-Wertes und eine Zellschwellung die Entstehung einer kardialen Hypertrophie zu begünstigen [111]. Zusammenfassend scheint SGK-1 einen Teil der Aldosteron-vermittelten Effekte in Hinblick auf die Pathogenese einer Herzinsuffizienz zu vermitteln [112, 113].

Der GR gehört zur gleichen Subklasse von nukleären Rezeptoren wie MR und AR und wird ebenfalls im Herz exprimiert. Glukokortikoide haben über den GR mannigfaltige Wirkungen auf Stoffwechsel und Inflammation. Es gibt Hinweise auf eine direkte Interaktion von GR und AR mit Ausbildung von Heterodimeren *in vitro* [114, 115]. Die Rolle des GR im Herzen selbst ist noch unklar. Eine pharmakologische Blockade des GR scheint auf die durch kardiale MR-Aktivierung vermittelten schädlichen Effekte keinen Einfluss zu haben [116, 117]. Jedoch begünstigt im Knockout-Modell von Mäusen die selektive Ausschaltung des GR-Gens in Kardiomyozyten die Entwicklung einer Herzinsuffizienz mit eingeschränkter LV-Funktion sowie Hypertrophie und führt zu erhöhter Mortalität [118]. Auf molekularer Ebene scheint hierbei eine Dysregulation bestimmter Gene zu bestehen, beispielsweise für den Ryanodin-2 Rezeptor oder Dystrophin, welche dann sekundär zu Hypertrophie und Herzinsuffizienz führen. Auf der anderen Seite zeigt sich im Rattenmodell, dass auch ein Exzess an Glukokortikoiden oben genannte Veränderungen und zusätzlich das Auftreten einer kardialen Fibrose über eine veränderte intrazelluläre Kalziumregulation begünstigen kann [119].

2.6 Fragestellung

Der physiologische Einfluss von Androgenen auf das kardiovaskuläre System ist bis heute unzureichend verstanden. Epidemiologisch lässt sich eine deutliche geschlechterabhängige Disparität in Hinblick auf das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen nachweisen, wobei auch Androgene dieses Phänomen zu beeinflussen scheinen. Im Rahmen einer Herzinsuffizienz oder nach akutem Myokardinfarkt spielt der MR und dessen pharmakologische Beeinflussung eine herausragende klinische Bedeutung mit prognostischer Relevanz. Im Rattenmodell gibt es Hinweise für eine Interaktion zwischen androgenem und mineralokortikoidem System, da eine AR-Blockade mit Flutamid zur Erhöhung des Serumaldosterons führt [120].

Der Serumspiegel von Aldosteron als spezifischer Ligand des MR wird hierbei maßgeblich beeinflusst von der Salzzufuhr und der damit verbundenen Aktivierung des RAAS. Die Abhängigkeit der Wirkung des Aldosterons im Herzen von der Menge an zugeführtem Natriumchlorid (NaCl) ist hierbei gut etabliert und soll auch für die Wirkung von Androgenen Berücksichtigung finden.

Zur Untersuchung der physiologischen Androgenwirkungen wurde ein Tiermodell herangezogen. Hierbei handelte es sich um Versuche mit männlichen Wistar-Ratten. Es sollte untersucht werden, wie sich die exogene Androgen-Substitution nach Orchiektomie auf die Expression der Steroidhormonrezeptoren AR, GR und MR im Herzen auswirkt. Ein Schwerpunkt ergab sich hierbei für den MR. Angestrebt wurde die Beleuchtung folgender Fragestellungen:

1. Zeigt sich eine Regulation des kardialen Mineralokortikoidrezeptors durch Androgene unter salzarmer beziehungsweise salzreicher Diät?
2. Inwiefern besteht eine Autoregulation des AR unter salzarmer beziehungsweise salzreicher Diät?
3. Erfahren Mineralokortikoidrezeptor-abhängige Gene eine gleichartig gerichtete Regulation durch Androgene beziehungsweise salzarme oder salzreiche Diät?
4. Besteht eine Regulation der kardialen 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 als zugrunde liegender Mechanismus mit möglicher Beeinflussung der lokalen Konzentration an Kortisol?
5. Wie verhält sich die relative Expression des Glukokortikoidrezeptors unter Androgengabe beziehungsweise nahrungsbedingter Salzzufuhr?

3. Materialien und Methoden

3.1. *Materialien*

3.1.1. **Primer, Antikörper, Enzyme, Längenstandards**

Primer für die Realtime-PCR als „Assays on Demand“ von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA):

Zielgen (Genprodukt)	Assay-ID	Produktgröße
Ar (AR)	Rn00560747_m1	75 bp
Nr3c1 (GR)	Rn00561369_m1	73 bp
Nr3c2 (MR)	Rn00565562_m1	79 bp
Sgk1 (SGK-1)	Rn00570285_m1	79 bp
Tgfb1 (TGF- β_1)	Rn00572010_m1	65 bp

Endogene Kontrolle (18S):

TaqMan® Ribosomal RNA Control Reagents (VIC Probe, Forward/Reverse Primer), Applied Biosystems Foster City, CA, USA

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-MR (6G1)	Labor von Celso Gomez-Sanchez, University of Mississippi, Mississippi, USA
Anti-HSD1 (H100)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA
Anti- β -Actin (C4)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA
Anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase from donkey	Amersham Biosciences, Little Chalfon Buckinghamshire, UK
Anti-mouse IgG-horseradish peroxidase from sheep	Amersham Biosciences, Little Chalfon Buckinghamshire, UK

Enzym/Enzym-Mix	Bezugsquelle
AMV Reverse Transcriptase	Promega, Madison, WI, USA
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega, Madison, WI, USA
Taqman Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Längenstandard	Bezugsquelle
Hyperladder I (200-10.000bp)	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Hyperpage Prestained Protein Marker	Bioline, Luckenwalde, Deutschland

3.1.2. Chemikalien und Biochemikalien

Material	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol (98%)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
2-Propanol (99,5%)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
5alpha-Dihydrotestosteron (5alpha-Androstane-3,17-dione)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Acrylamid/Bis solution 29:1 (30%)	Bio-Rad, Hercules, USA
Agarose	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Ammonium Persulfat	Bio-Rad, Hercules, USA
Borsäure 99,5%	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Coomassie Violet R150	Merck, Darmstadt, Deutschland
DEPC Treated Water	Invitrogen, Camarillo, USA
EDTA (0,5 M)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol denaturated 95%	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ethanol per analysis 100%	Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, NL
Flutamid	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland

Igepal CA-630	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaN ₃ (Sodium Azid)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdesoxycholat	Fluka Chemie, Buchs, Deutschland
Natronlauge (2 mol/l)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphate buffered saline tablets	Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA
Ponceau Red	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Salzsäure 25%	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS	Bio-Rad, Hercules, USA
SDS for electrophoresis (99%)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
SDS Solution (10% w/v)	Promega, Madison, USA
Spironolactone	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
TEMED	Bio-Rad, Hercules, USA
Testosterone (≥98%)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Tris Base (Trizma® base)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Triton X 100	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

3.1.3. Lösungen und Puffer

Kommerzielle Puffer:

Material	Bezugsquelle
10x Loading Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
10x Reverse Transcription Buffer	Promega, Madison, WI, USA

TBE-Puffer:

10,8 g Tris-Base; 5,5 g Borsäure; 4 ml EDTA (0,5 M)
mit H₂O bidest. auf 1 l auffüllen

RIPA-Puffer:

50 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 1% Igepal 40; 0,5% Natrium-Desoxycholat;
0,1% SDS

Protease-Inhibitor (Complete Mini, Roche, 1 Tablette auf 10 ml Pufferlösung)

Coomassie-Blau Färbelösung:

Coomassie Violet R150	0,1 g
Methanol	45 ml
Essigsäure	45 ml
H ₂ O bidest.	auf 100 ml auffüllen

Ponceau-Rot Färbelösung:

0,1% Ponceau Red; 0,5% Essigsäure; 100 ml H₂O bidest.

0,05% PBS-Tween:

4 Phosphate-buffered saline tablets; 2 l H₂O bidest.; 1 ml Tween 20

0,1% PBS-Tween:

4 Phosphate-buffered saline tablets; 2 l H₂O bidest.; 2 ml Tween 20

TBS:

50 mM Tris; auf pH 7,4 einstellen

2x Laemmli-Puffer:

10% SDS	200 µl
Glycerol (99%)	100 µl
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	125 µl
H ₂ O	25 µl

Anschließend Hinzugabe einer Messerspitze Bromphenolblau, Aliquotieren auf 90 µl und Lagern bei -20 °C. Bei Verwendung Zugabe von 10 µl 2-Mercaptoethanol.

Stripping-Puffer:

100 mM 2-Mercaptoethanol; 2% SDS; 62,5 mM Tris

SDS-PAGE-Laufpuffer:

Tris Base 30,28 g
Glycin 144 g
SDS 10 g
NaN₃ 0,1 g
Auf 1 l mit H₂O bidest. auffüllen

Toubin-Puffer:

3,03 g Tris Base; 14,4 g Glycin; 200 ml Methanol; 800 ml H₂O bidest.

3.1.4. Kommerzielle Kits

Material	Bezugsquelle
RNeasy Mini Kit	Qiagene, Hilden, Deutschland
DC™ Protein Assay (Reagenz A, B, S)	Bio-Rad, Hercules, USA
Reverse Transcription System	Promega, Madison, WI, USA

3.1.5. Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
Amersham Hybond blotting paper	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK
Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK
Falcon Rundbodenröhrchen (5 ml)	Becton Dickinson Labware, NJ, USA
Kryo-Tubes (1,8 ml)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Nunc MicroWell 96-Well Microplates	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt, Deutschland
PCR iCycler PCR Plates, 96 wells	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
PCR Sealers Microseal 'B' Film	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Pipettenspitzen 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	VWR, Darmstadt, Deutschland
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, NJ, USA
Short und Spacer Glasplatten Mini-Protean 3	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Thermo-Tube (0,2 ml)	Abgene, Epsom, UK
Wägeschälchen Diamant (25 ml)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zentrifugenröhrchen mit Schraubkappen (15 ml, 50 ml)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.6. Geräte

Material	Bezugsquelle
Analysenwaage Sartorius BP 121 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Analysenwaage Scout Pro	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Belichtungskassette 8x10 inch	Appligene, Watford, UK
Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Elektrophorese Kammer MGU-302	C.B.S. Scientific Co., Del Mar, CA, USA
Galaxy Mini Star Tischzentrifuge	VWR, Darmstadt, Deutschland
Genesys 10 UV Scanning	Thermo Spectronic, Wuppertal
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
iMark Microplate Absorbance Reader	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Kodak X-OMAT Multiloader 300 Plus	Kodak AG, Stuttgart, Deutschland
LabSonic Ultraschallhomogenisator	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Mikrowellenofen Micromaxx MM41580	Medion, Essen, Deutschland
Millipore-Ionenaustauscheranlage Milli-Q	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Mini Protean 3 Cell Elektrophorese Kammer	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mini Vortexer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Model 1000/500 Power Supply	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Model 200/2.0 Power Supply	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Motorhandstück MHX (E)	Xenox, Wecker, Luxemburg
MR 3002 (Magnetrührer)	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Nano Drop TM	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
pH 211 Microprocessor (pH-Meter)	Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland
Pipette Eppendorf research 0,1- 2,5µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten Eppendorf Reference 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plattformschüttler Titramax 1000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Tissue Lyser II	Qiagene, Hilden, Deutschland
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Typhoon 8600 Variable Mode Imager	Amersham Biosciences, Little Chalfon Buckinghamshire, UK

3.1.7. Software

Material	Bezugsquelle
Image Master TotalLab v.1.11	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Microsoft Office 2007	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Graph Pad Prism 5, Version 5.01	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Endnote X7	Thomson Reuters, New York City, NY, USA

3.2. Methoden

3.2.1. *In vivo*-Tiermodell

Männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 180-200 g wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) erworben. Hierbei handelte es sich um Tiere im Alter von 8 - 10 Wochen. Die Tierversuche wurden in Übereinstimmung der Grundsätze des Institutional Animal Care and Use Committee sowie nationaler Bestimmungen durchgeführt. Es erfolgte die Einholung eines Ethikvotums und die Genehmigung durch die Tierschutzkommission.

Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden die Tiere unter konstanten Bedingungen bei 22-24 °C, 50-60% relativer Luftfeuchtigkeit, sowie einem simulierten 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus mit freiem Zugang zu Wasser und Nahrung gehalten. Zur Stressreduktion wurden drei Tiere pro Käfig gehalten. 72 Stunden nach Erhalt der Tiere erfolgte die Gonadektomie auf zuvor beschriebene Weise [120, 121].

Den jeweiligen experimentellen Gruppen wurden sechs Tiere zufällig zugeordnet. Die Hälfte der Tiere erhielt eine natriumreiche Diät mit Futter von 4% NaCl-Gehalt (sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) sowie Trinkwasser mit 0,09% NaCl-Gehalt. Die anderen Tiere wurden unter eine natriumarme Diät gesetzt, welche aus Nahrung mit NaCl <0,03% und Trinkwasser *ad libidum* bestand. Nach einer Erholungs- und Adaptationszeit der Tiere wurde ab dem 20. Tag des Versuchszeitraumes eine tägliche Subkutaninjektion mit entweder 2,86 mg/kg Körpergewicht Testosteron (1 mg/Tier) gelöst in Oleum sesami; 2,86 mg/kg Körpergewicht Dihydrotestosteron (1 mg/Tier) gelöst in Oleum sesami bzw. Placebo (Oleum sesami) vorgenommen [120, 121]. Zusätzlich erhielten die Tiere täglich eine zweite Subkutaninjektion mit entweder 30 mg/kg Körpergewicht Flutamid (10,5 mg/Tier), gelöst in Oleum sesami/Ethanol (v/v 11:1); 50 mg/kg Körpergewicht Spironolacton (17,5 mg/Tier), gelöst in Castor oil/Benzylbenzoat (v/v 5:1), bzw. Placebo (Oleum sesami/Ethanol). Die Tiere, welche als zusätzliche Injektion Placebo erhielten, werden im Folgenden als Hauptbehandlungsgruppe bezeichnet. Den Versuchsaufbau illustriert Abbildung 4. Nach einer Behandlungszeit von 16 Tagen wurden die Tiere getötet, Gesamtkörpergewicht sowie Prostatagewicht bestimmt und Blut sowie Herzen asserviert. Eine Stunde vor Tötung erfolgte die letzte Injektion [120, 121].

Die anschließende Bestimmung der Hormonkonzentrationen im Serum erfolgte mittels Radioimmunoassay für Testosteron (DSL-4100, Diagnostic Systems Laboratories Deutschland GmbH, Sinsheim), 17 β -Estradiol (DSL-4800, Diagnostic Systems Laboratories Deutschland GmbH, Sinsheim), sowie mit Hilfe eines ELISA für 5 α -Dihydroxytestosteron (DB52021, IBL International GmbH, Hamburg).

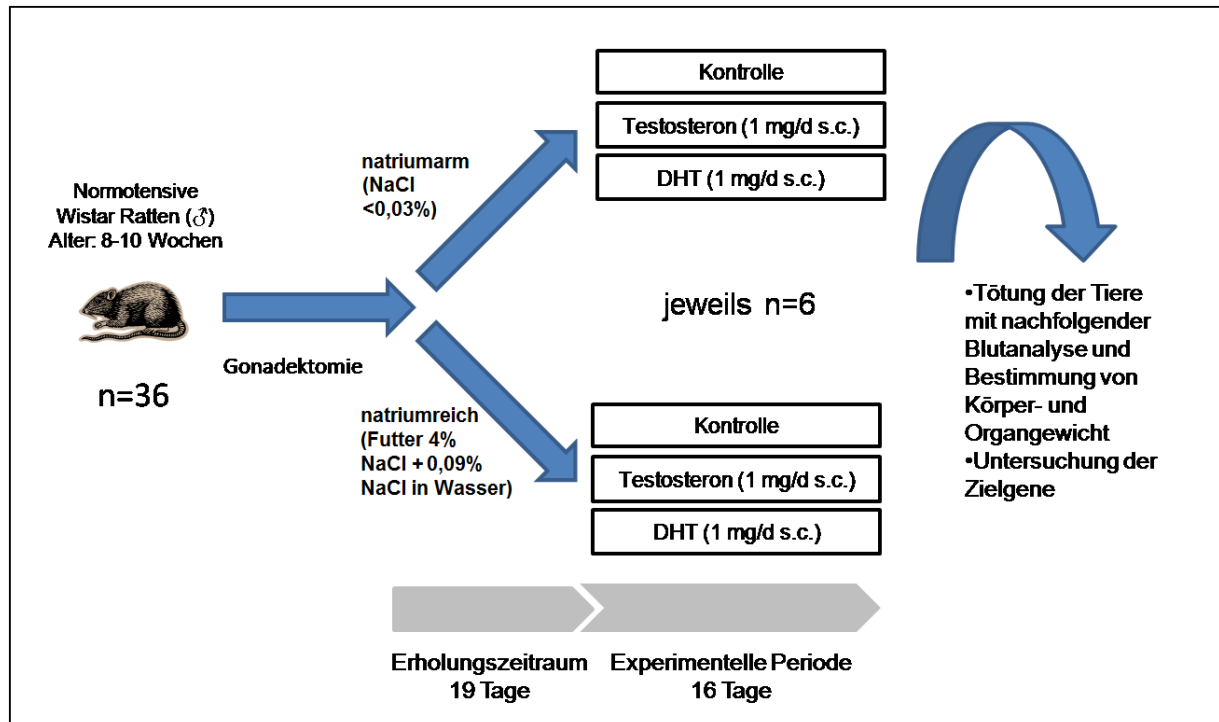


Abbildung 4: Schematischer Versuchsaufbau für die Hauptbehandlungsgruppe ohne zusätzliche Injektion von Flutamid oder Spironolacton gelöst in Oleum sesami.

3.2.2. RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion wurde das kommerziell verfügbare Kit RNeasy® verwendet. Zur Lysierung des Gewebes wurden pro Probe 700 μ l RLT-Puffer in ein steriles 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und auf Eis vorgekühlt. Dem Puffer wurde zuvor pro Probe 7 μ l β -Mercapto-Ethanol als reduzierendes Agens hinzugefügt. Eine kleine Menge an Gewebe (<30 mg) wurde mit einem sterilen Skalpell entnommen, wobei möglichst der gesamte Querschnitt des Rattenherzens repräsentiert werden sollte. Die Proben der Tiere ohne zusätzliche Injektion von Spironolacton oder Flutamid wurden zuvor unter flüssigem Stickstoff pulverisiert, sodass in diesem Fall eine kleine Menge mit einem Laborspatel entnommen werden konnte. Alle Instrumente wurden vor und jeweils nach Probenentnahme gründlich mit 75% Ethanol gereinigt. Das

entnommene Gewebe wurde unmittelbar in den Lyse-Puffer gegeben und auf Eis gestellt. Zur Lyse und Homogenisierung der Proben wurden rostfreie Stahlkugeln den Reaktionsgefäßen zugefügt und im Tissue Lyser® für 2 min bei 30 Hz geschüttelt. Danach wurde das gesamte Volumen in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei Raumtemperatur für 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:1 mit 70%-igem unvergälltem Ethanol verdünnt, max. 700 µl auf die mitgelieferte Säule des Kits gegeben und für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die verbliebene Probenmenge in gleicher Weise aufgetragen und zentrifugiert. Es folgten Waschschriffe mit 700 µl RW1-Puffer und 500 µl RPE-Puffer (jeweils Bestandteil des Kits) mit jeweils anschließender Zentrifugierung für 15 s bei 10.000 rpm, wobei zwischen beiden Waschschriffen das Sammelgefäß gewechselt wurde. Es folgte ein erneuter Waschschriff mit 500 µl RPE-Puffer, an den sich eine Zentrifugierung von 2 min mit 10.000 rpm anschloss. Zur vollständigen Trocknung der Säule wurde nochmals für 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde nun auf ein neues steriles Sammelgefäß gesetzt und eine zweimalige Eluierung mit 20 µl RNase-freiem Wasser und darauffolgender Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm durchgeführt. Die extrahierte RNA wurde sofort auf Eis gelegt und nachfolgend bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.3. RNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der RNA erfolgte spektrometrisch mit dem NanoDrop®. Hierbei wurden 1,5 µl der RNA direkt auf die Probenhalterung aufgetragen und die Extinktion im Bereich von 220 bis 350 nm gemessen. Als Blindwert wurde RNase-freies Wasser benutzt und die RNA-Konzentration mit Hilfe des Extinktionsmaximums bei 260 nm bestimmt. Die Ratio 260/280 lag hierbei zwischen 1,9 und 2,1.

3.2.4. Überprüfung der RNA-Integrität

Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Ein 1%-iges Agarosegel wurde aus 40 ml TBE-Puffer und 0,4 g Agarose hergestellt, beides in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und bis zur vollständigen Auflösung geschwenkt. Nach Abkühlen der noch flüssigen Lösung wurden 4 µl Vista Green zugegeben und das Gel in der Gelelektrophoresekammer gegossen. Pro Tasche wurden 10 µl des folgenden Ansatzes aufgetragen und bei 100 V für 45 min elektrophoretisch aufgetrennt:

Probe (RNA):	1 µl
DEPC-H ₂ O:	8 µl
10x Loading Buffer	1 µl
<hr/>	
	10 µl

Danach wurde das Ergebnis mit Hilfe des Typhoon-Scanners (System zur Visualisierung von Fluoreszenz) visualisiert, beruhend auf den Fluoreszenz-Eigenschaften Vista Greens bei Anregung mit 532 nm.

3.2.5. Synthese der komplementären DNA (cDNA)

Um die RNA in cDNA umzuwandeln, wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Hierzu wurde das spezifische Volumen für 1 µg RNA in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit DEPC-behandeltem Wasser auf 19,5 µl aufgefüllt und kurz auf dem Vortexer geschüttelt. Um nun die RNA zu denaturieren und deren Sekundärstrukturen zu lösen, wurde die Lösung für 10 min bei 70 °C auf dem Heizblock (Thermomixer) inkubiert. Die Proben wurden kurz herunter zentrifugiert und auf Eis abgekühlt. Danach wurde pro Probe 20,5 µl Mastermix hinzugegeben, der sich aus folgenden Reagenzien zusammensetzte (Reverse Transcription System):

MgCl (25 µM)	8 µl
Reverse Transcription Buffer 10x	4 µl
Desoxynukleotid-Mix (10 µM)	4 µl
RNase Inhibitor (20–40 u/µl)	1 µl
AMV Reverse Transcriptase (10 u/µl)	1,5 µl
Random Primers	2 µl
	<hr/>
	20,5 µl

Die Proben wurden nun zunächst für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine effiziente Hybridisierung der Random Primer zu gewährleisten. Danach erfolgte die eigentliche cDNA-Synthese bei 42 °C für 15 min auf dem Heizblock. Darauf schloss sich eine Enzymaktivierung bei 95 °C für 5 min an. Die fertige cDNA wurde kurz abzentrifugiert und auf Eis abgekühlt. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

3.2.6. Quantitative Real-Time PCR

Die hier eingesetzte methodische Variante der quantitativen Real-Time PCR benutzt spezifische Sonden (TaqMan®-Sonden), die mit zwei fluoreszierenden Verbindungen gekoppelt sind. Diese Sonden binden somit nur an die spezifische Sequenz des gewünschten Zielgens. TaqMan®-Sonden sind so aufgebaut, dass sich an ihrem 3'-Ende ein sogenannter Quencher befindet und zusätzlich ein Reporter-Fluorophor am 5'-Ende. Wird die intakte Sonde nun angeregt, wird in diesem Zustand die Fluoreszenz des Reporters durch dessen molekulare Nähe zum Quencher unterdrückt. Dieses Phänomen beruht auf dem Prinzip des *Fluorescence resonance energy transfer* (FRET). Hybridisiert die Sonde nun mit dem DNA-Strang, kommt es bei der darauffolgenden Elongation zur Hydrolyse des Reporter-Fluorophors von der im Replikationsprodukt verbleibenden Sonde. Dies ist begründet in der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase, welche bei dieser Methode ausgenutzt wird. Das freigesetzte Reporter-Fluorophor wird durch seine Entfernung nun nicht mehr in seiner Fluoreszenz gehemmt und emittiert in der jeweils spezifischen Wellenlänge. Die am Ende jedes Elongationsschrittes gemessene Fluoreszenz steigt somit proportional zur zunehmenden Menge an PCR-Produkt. Diese hingegen ist abhängig von der initialen Menge an Ausgangsprodukt. Es existieren eine Reihe

unterschiedlicher Reporter-Fluorophore, wobei für diese Arbeit VIC (18S) und FAM (jeweilige Zielgene) benutzt wurden.

Aufgrund der Möglichkeit einer schwankenden Effizienz der cDNA-Synthese sollte das Zielgen zu einer internen Kontrolle in Bezug gesetzt werden. Hierfür wurde mit Hilfe eines kommerziell voroptimierten Assays (Applied Biosystems) die Expression der 18S rRNA bestimmt. Der Ansatz wurde gemäß folgendem Schema pipettiert und 1 µl des synthetisierten cDNA-Ansatzes zugefügt (25 ng cDNA).

18S Forward Primer (10 µl)	0,125 µl
18S Reverse Primer (10 µl)	0,125 µl
18S Probe (40 µl)	0,125 µl
DEPC-H ₂ O	1,75 µl
TaqMan Universal Master Mix	12,5 µl
<hr/>	
	24 µl

Auch für die jeweiligen Zielgene wurden voroptimierte kommerziell verfügbare „Assays on Demand“ (Applied Biosystems) benutzt.

Primer-Probe-Mix	1,25 µl
DEPC-H ₂ O	10,25 µl
TaqMan Universal Master Mix	12,5 µl
<hr/>	
	24 µl

Alle Proben wurden als Triplikate auf einer 96-Well Platte gemessen, in mindestens drei Läufen für die interne Kontrolle und mindestens zwei Läufen für das jeweilige Zielgen. Um die Läufe untereinander anpassen zu können, wurde stets eine Verdünnungsreihe mitgeführt (1:1 – 1:1000) sowie eine Negativkontrolle mit DEPC-H₂O. Die Verdünnungsreihe wurde aus einem Pool von cDNA von 10 verschiedenen Tieren erstellt und mit DEPC-H₂O entsprechend verdünnt. Alle Messungen wurden als Single-Plex-Messungen durchgeführt. Die PCR-Platte wurde mit Kunststoffilm fest verschlossen und die Ansätze für eine Minute bei 2.000 rpm herunter zentrifugiert. Die PCR-Reaktion wurde gemäß folgendem zweistufigen Protokoll auf dem MyiQ Real-Time Cycler (BioRad) durchgeführt:

- | | | | |
|-----|-------|-------------|---------------------------------|
| 1.) | 50 °C | 2 min | |
| 2.) | 95 °C | 10 min | |
| 3.) | 95 °C | 0:15 min | } Wiederholung
für 44 Zyklen |
| | 60 °C | 1 min | |
| 4.) | 4 °C | <i>hold</i> | |

3.2.7. Auswertung und statistische Analyse der Real-Time PCR

Nach Ablauf der Real-Time PCR wurden die Kurven in der logarithmischen Ansicht dargestellt und der lineare Verlauf der Graphen aufgesucht. In diesem Bereich wurde der Threshold als Schnittpunkt mit den Graphen gelegt, welcher als ΔCt -Wert bezeichnet wird. Alle verbliebenen Versuchsläufe eines Gens wurden mit Hilfe der Standardreihe untereinander angeglichen. Auf diese Weise konnten die Werte für 18S rRNA und das untersuchte Zielgen für jede Probe in einer Tabellenkalkulation gesammelt werden. Für das Zielgen gingen alle Messwerte in die weitere Auswertung ein, die in der Spannweite von maximal 0,5 ΔCt -Werten lagen (für die interne Kontrolle 0,8 ΔCt -Werte). Aus diesen Werten wurde nun jeweils das arithmetische Mittel gebildet. Die relative Expression wurde nun mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode berechnet, indem der Mittelwert des Zielgens von dem des internen Standards subtrahiert wurde. Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte einer Behandlungsgruppe wurden als arithmetisches Mittel zusammengefasst und danach der Wert für die jeweilige Behandlungsgruppe von der Kontrollgruppe (Placebo, natriumarm) subtrahiert. Die relative Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte nun mit folgender Formel bestimmt werden:

$$\mathbf{n\text{-fache Expression (Kontrolle zu jeweiliger Behandlung)} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}}$$

Zur statistischen Auswertung wurden die ΔCt -Werte für die einzelnen Versuchstiere der jeweiligen Gruppen herangezogen (jeweils $n=6$) und mit Hilfe der REST-Software und des enthaltenen Pair Wise Fixed Reallocation RandomizationTest© eine

statistische Auswertung vorgenommen [122]. Als statistische Signifikanz wurde ein $p < 0,05$ angenommen.

3.2.8. Proteinextraktion

Zur Isolierung des Gesamtproteins wurde RIPA-Puffer benutzt. Die Gewebeprouben wurden zu 250 μl des Lysis-Puffers gegeben und auf Eis kurz mit dem Motorhandstuck homogenisiert und anschlieBend auf Eis in kurzen Intervallen fUr insgesamt jeweils rund 30 s sonifiziert. AnschlieBend wurden die Proben fUr 10.000 rpm bei 4 $^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert und der Ueberstand in ein steriles Reaktionsgefass ueberfuehrt und bei -20 $^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.2.9. Proteinbestimmung nach Bradford

Hierbei bilden Proteine im ersten Reaktionsschritt im alkalischen Milieu Komplexe mit Kupfer(II)-Ionen aus, welche dann im zweiten Schritt reduziert werden und zur Bildung von Molybdänblau aus Folinreagenz fUhren und damit zur Extinktionszunahme bei 750 nm. In diesem Fall wurde das D_C Protein Assay (Biorad) benutzt, wobei die Proben im Verhaeltnis 1:5 mit RIPA-Puffer vorverdunnt wurden, um Werte im linearen Messbereich zu gewaehrleisten. Jeweils 5 μl Probe wurden 30 μl Wasser, 25 μl Loesung A (bestehend aus Reagenz A und Reagenz S) sowie 200 μl Reagenz B hinzugefuegt. Nach kurzem Schuettern der Loesungen auf dem Vortexer wurden alle Ansatze fUr 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 750 nm mittels eines Mikroplatten Absorptionslesers ermittelt. Die Konzentration konnte durch eine parallel gemessene Standardreihe (0,25-1,5 mg/ml) mit Hilfe einer Standardgeraden bestimmt werden, wobei anschlieBend der Vorverdunnungsfaktor der Proben beruecksichtigt wurde.

3.2.10. Prinzip der SDS-PAGE und des Western Blots

Bei der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) werden Proteine lediglich in Abhaengigkeit von ihrer Groe aufgetrennt. Dabei migrieren Proteine von kleinerem Molekulargewicht schneller im elektrischen Feld als groe Peptidketten, da diese vom molekularen Netz des Acrylamids staerker zurueckgehalten werden. Die aufgetrennten Proteine werden anschlieBend auf eine Membran

übertragen und die spezifischen Banden mit Hilfe von Antikörpern detektiert, wobei anhand der Signalstärke eine Aussage über den Grad der Proteinexpression möglich ist.

3.2.11. SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Gewebelysate wurde ein Polyacrylamidgel mit einer Stärke von 0,75 mm hergestellt. Zunächst wurde das Trenngel zwischen beide Glasplatten gegossen und für 20 min eine vollständige Polymerisierung gewährleistet. Zur gleichmäßigen Abtrennung wurde zuvor 2-Propanol auf das noch flüssige Gel gegeben. Danach wurde dieses entfernt und das Trenngel auf das Sammelgel gegossen, ein Kamm für zehn Vertiefungen eingetaucht und das Gel für weitere 40 min stehen gelassen.

Jeweils 30 µg Proteingemisch (für anti-HSD-1 50 µg) wurden pro Tasche aufgetragen und zuvor zusammen mit 2x Laemmli-Puffer für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Page Puffer initial für 20 min bei 70 V, dann bei 130 V bis zur vollständigen Auftrennung der Proteinfractionen.

	<u>Trenngel (10%)</u>	<u>Sammelgel</u>
30 % Acrylamid / Bis - Lösung	3,33 ml	1,25 ml
3 M Tris (pH 8,8)	1,25 ml	-
0,5 M Tris (pH 6,8)	-	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml
1,5% APS	0,5 ml	0,5 ml
Millipore-H ₂ O	4,82 ml	5,65 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml

3.2.12. Immunoblot

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte in einem semi-wet System (Biorad). Zwischen je drei Lagen aus mit Towbin-Puffer getränktem Whatman-Papier wurde das Gel auf die zuvor für 10 s in Methanol aktivierte PVDF-Membran gelegt. Nach Entfernen aller Luftblasen wurde der Transfer bei 0,1 A für 135 min durchgeführt. Der Erfolg des Transfers wurde durch Anfärben

der Membran mit Ponceau Rot-Lösung überprüft. Um die unspezifische Bindung der Antikörper an die freigebliebenen Bindungsstellen der Membran zu verhindern, wurde diese für 1 Stunde mit 10% Milchpulver in PBS-Tween inkubiert. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit 0,05% PBS-Tween wurde die Membran mit der Primärantikörper-Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für den anti-MR Western Blot erfolgte dies wie zuvor beschrieben 1:1000 verdünnt in 50 mM TBS (pH 7,4), für den anti-HSD1 hingegen 1:1000 verdünnt in 0,1 % PBS-Tween mit 2 % BSA.

Für die Bestimmung von β -Actin als interne Kontrolle konnte die Membran zwischen den erwarteten Höhen der Banden getrennt werden und beide Membranteile gesondert inkubiert werden. Beim Western Blot für 11 β -HSD1 hingegen mussten gebundene Antikörper unter 30-minütiger Inkubation mit Stripping Buffer bei 50 °C gelöst werden. Danach erfolgten zwei Waschschrte und ein erneutes Blocken der Membran. Der Antikörper gegen β -Actin wurde in einer Verdünnung von 1:2000 in PBS-Tween mit 2 % BSA benutzt.

Nach erneutem Waschen mit PBS-Tween wurde die Membran mit dem speziesspezifischen Sekundärantikörper, an dem das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend auf die zuvor genannte Weise gewaschen und mit ECL-Detektionsreagenz für 1 min inkubiert. Überschüssige Lösung wurde abgegossen und die Membran zwischen Folie in die Filmkassette gelegt, wobei mittels einer Rolle nochmals ECL-Lösung aus der Membran entfernt wurde. Die Antikörperbindung konnte mittels Belichtung des Films durch Emission bei ~428 nm und anschließender Entwicklung mit dem Kodak X-OMAT Multiloader 300 Plus visualisiert werden.

3.2.13. Quantifizierung und densitometrische Auswertung des Western Blots

Zur Quantifizierung der Proteinexpression des MR wurden die Filme eingescannt, danach mit der Software Image Master TotalLab die Stärke der Banden densitometrisch ermittelt und anschließend ins Verhältnis mit der internen Kontrolle β -Actin gesetzt. Jeweils vier Proben pro Behandlungsgruppe von unterschiedlichen Versuchstieren wurden hierbei untersucht und die relative Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe berechnet.

3.2.14. Statistische Analyse des Western Blots

Zur statistischen Auswertung wurden die Ratio der MR-/ β -Actin-Expression für die einzelnen Versuchstiere der jeweiligen Gruppen herangezogen (jeweils n=4) und mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests eine statistische Auswertung vorgenommen. Als statistische Signifikanz wurde ein $p < 0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der Tiere

Anhand der klinischen Daten kann zunächst festgestellt werden, dass die Gabe von Testosteron und DHT zu einer Zunahme des Körpergewichts in beiden Diätgruppen im Vergleich zur Kontrolle nach Gonadektomie führte. Dies erreichte jedoch lediglich für die Testosteron-behandelten Tiere der natriumarmen Diät statistische Signifikanz (siehe Tabelle 1). Die Aufnahme des Natriums mit der Nahrung hingegen zeigte keinen Einfluss auf das Körpergewicht. In Hinblick auf die Hormonspiegel zeigt sich wie erwartet eine nicht bzw. kaum detektierbare Konzentration an Testosteron und DHT nach erfolgter Gonadektomie und Placebo-Gabe. Testosteron-behandelte Tiere zeigten weiterhin signifikante Konzentrationen an DHT. Die Serumspiegel von 17 β -Estradiol unterschieden sich in keiner der Gruppen.

Klinische Parameter	Natriumarme Diät			Natriumreiche Diät		
	Kontrolle	Testosteron	DHT	Kontrolle	Testosteron	DHT
Körperendgewicht (g)	343 \pm 6	399 \pm 13 **	374 \pm 6	344 \pm 12	377 \pm 13	365 \pm 14
Serum Testosteron (nmol/l)	0,0 \pm 0,0	43,4 \pm 3,1 ***	2,4 \pm 0,3	0,0 \pm 0,0	30,8 \pm 2,0 ***	1,5 \pm 0,6
Serum DHT (nmol/l)	0,3 \pm 0,0	4,8 \pm 0,4 ***	5,0 \pm 0,4 ***	0,3 \pm 0,0	4,0 \pm 0,1 ***	2,5 \pm 0,4*
Serum 17 β -Estradiol (pmol/l)	21,6 \pm 1,9	16,5 \pm 0,6	16,7 \pm 1,4	21,6 \pm 1,2	18,2 \pm 1,0	19,8 \pm 1,5

Tabelle 1. Bestimmung von Körpergewicht und Hormonspiegeln männlicher Wistar-Ratten (jeweils n=6) im Anschluss an den 16-tägigen Behandlungszeitraum. *: p<0,05 vs. Kontrolle der jeweiligen Diät; **: p<0,01 vs. Kontrolle der jeweiligen Diät; ***: p<0,001 vs. Kontrolle der jeweiligen Diät.

Als weiterer Parameter für die Evaluation der Wirksamkeit exogener Androgene nach Orchiektomie kann das Gewicht der Prostata herangezogen werden. Der Einfluss von Testosteron und DHT ist hierbei gut etabliert. Als Bestätigung für eine adäquate biologische Wirkung ist in Abbildung 5 die Zunahme des Gewichtes der gesamten Prostata in Tieren unter salzreicher Diät dargestellt. Für die Tiere der salzreichen Behandlung ergibt sich ein gleichartiges Bild. Zusätzlich zeigt sich die vollständige Antagonisierbarkeit der Effekte bei zusätzlicher Flutamid-Gabe (FLUTA). Das Gewicht unter Testosterongabe entspricht hierbei in etwa dem physiologischen Gewicht intakter, nicht-gonadektomierter Tiere (INT).

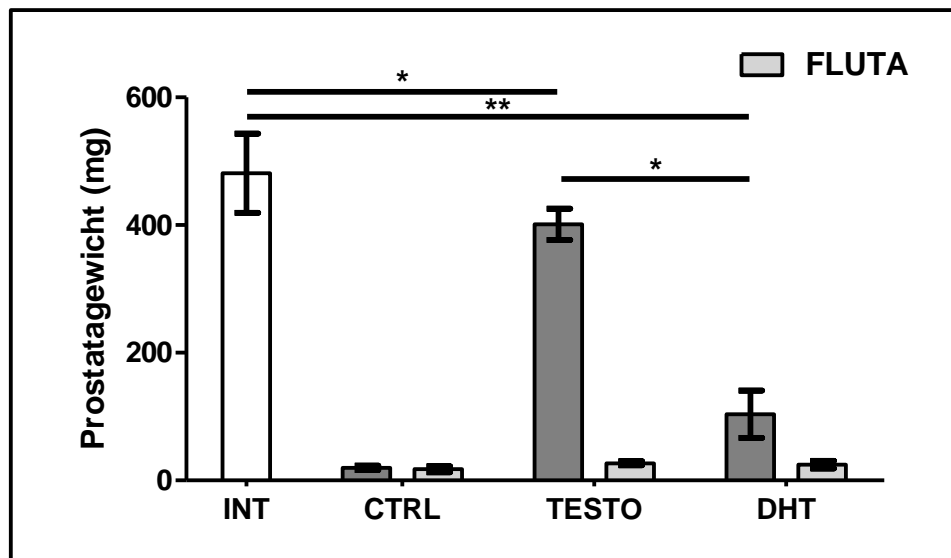


Abbildung 5: Gesamtgewicht der Prostata von männlichen Wistar-Ratten unter natriumarmer Diät. INT: Prostatagewicht von nicht-gonadektomierten Tieren unter natriumarmer Behandlung (n=4), restliche Tiere nach Gonadektomie und Androgen-Substitution (TESTO, DHT; jeweils n=6), bzw. Placebo (CTRL), FLUTA: Tiere mit zusätzlicher Injektion von 10,5 mg Flutamid. Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung (SD). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ (nicht alle Signifikanzen aus Gründen der Übersichtlichkeit gekennzeichnet).

4.2. mRNA Expression des Androgenrezeptors

Grundlage für die Androgen-vermittelten Effekte im Herzen ist die Expression des AR. Die Expression auf Ebene der mRNA ist in Abbildung 6 gezeigt. Hierbei konnte demonstriert werden, dass es zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den Behandlungsgruppen kam. Sowohl Androgene als auch die mit der Nahrung aufgenommene Salzmenge scheinen somit keinen Einfluss auf die Expression des AR im Herzen zu nehmen.

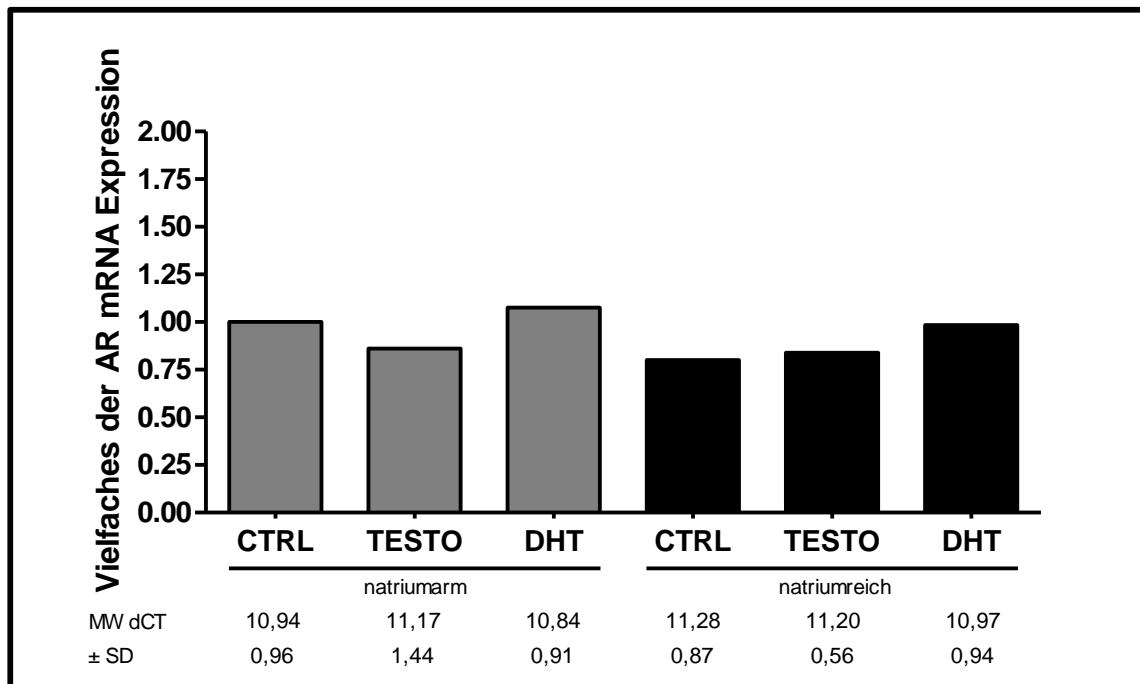


Abbildung 6: Vielfache Veränderung der kardialen mRNA Expression des Androgenrezeptors in orchiectomierten männlichen Wistar-Ratten. Kontroll-Tiere der natriumarmen Diät als Einfaches der Expression dargestellt. Mittelwert (MW), Standardabweichung (\pm SD).

4.3. mRNA Expression des Mineralokortikoidrezeptors

4.3.1. Hauptbehandlungsgruppen

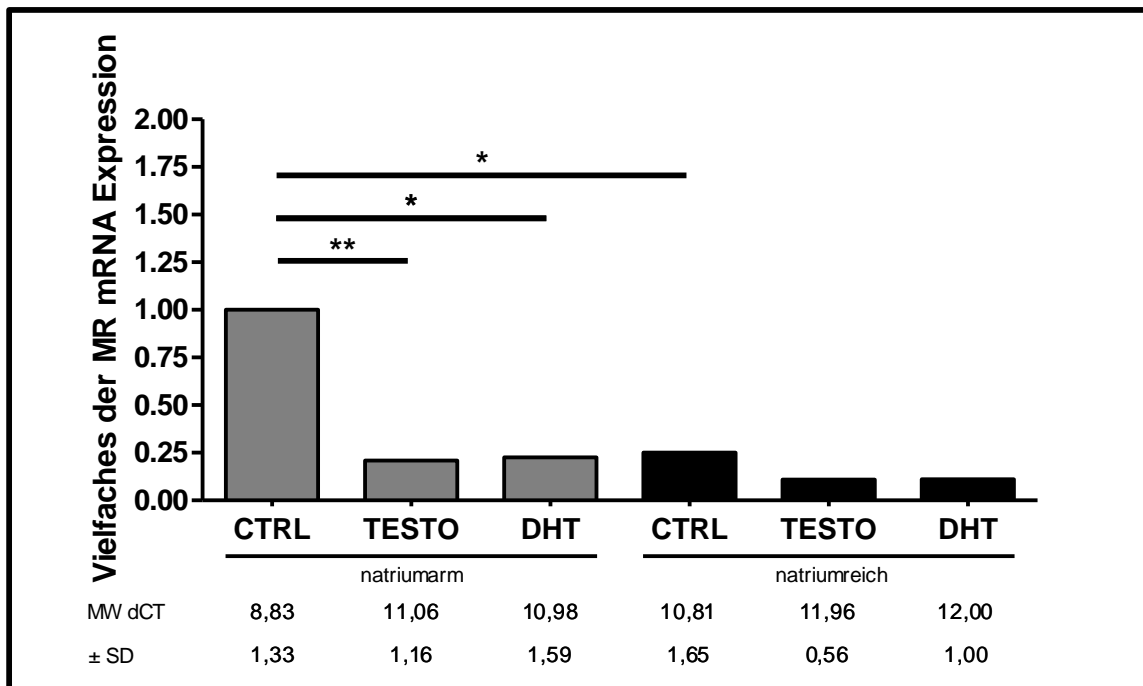


Abbildung 7: Vielfache Veränderung der kardialen mRNA Expression des Mineralokortikoidrezeptors in orchiectomierten männlichen Wistar-Ratten. Kontroll-Tiere der natriumarmen Diät als Einfaches der Expression dargestellt. Mittelwert (MW), Standardabweichung (\pm SD). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Abbildung 7 zeigt die relative Expression des MR. Zu erkennen ist eine deutliche Herunterregulation der mRNA bei Tieren mit restriktiver Salzaufnahme und gleichzeitiger Androgen-Substitution. Die Tiere unter Testosterongabe zeigten eine 4,8-fach niedrigere Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe der salzarmen Behandlung ($p < 0,05$). Unter DHT-Gabe kam es zu einer 4,4-fachen Herunterregulation ($p < 0,05$).

Weiterhin zeigten die Tiere mit hoher Salzaufnahme und ohne Androgen-Stimulation ein niedrigeres Niveau an mRNA des MR: Die Kontroll-Tiere der natriumreichen Diät zeigten lediglich eine Expression, die 25% der Expression der Kontroll-Tiere unter Salzrestriktion entsprach ($p < 0,05$). Unter Stimulation mit Androgenen kam es auch bei den Tieren mit natriumreicher Diät zu einer zusätzlichen Reduktion des mRNA Gehaltes für den MR, jedoch wurde keine statistische Signifikanz erreicht.

4.3.2. Effekte unter zusätzlicher Gabe von Flutamid und Spironolacton

Weiterführend sollte zusätzlich untersucht werden, inwiefern die Effekte in Bezug auf die Regulation des MR durch den spezifischen AR-Antagonist Flutamid aufzuheben sind. Da eine statistisch signifikante Regulation nur für die Tiere unter natriumarmer Diät gefunden wurde, wurde auf eine Messung der restlichen Versuchsgruppen verzichtet. Abbildung 8 verdeutlicht, dass Herunterregulation bei zusätzlicher Flutamid-Gabe vollständig antagonisierbar ist. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollgruppen mit bzw. ohne zusätzliche Flutamid-Injektionen.

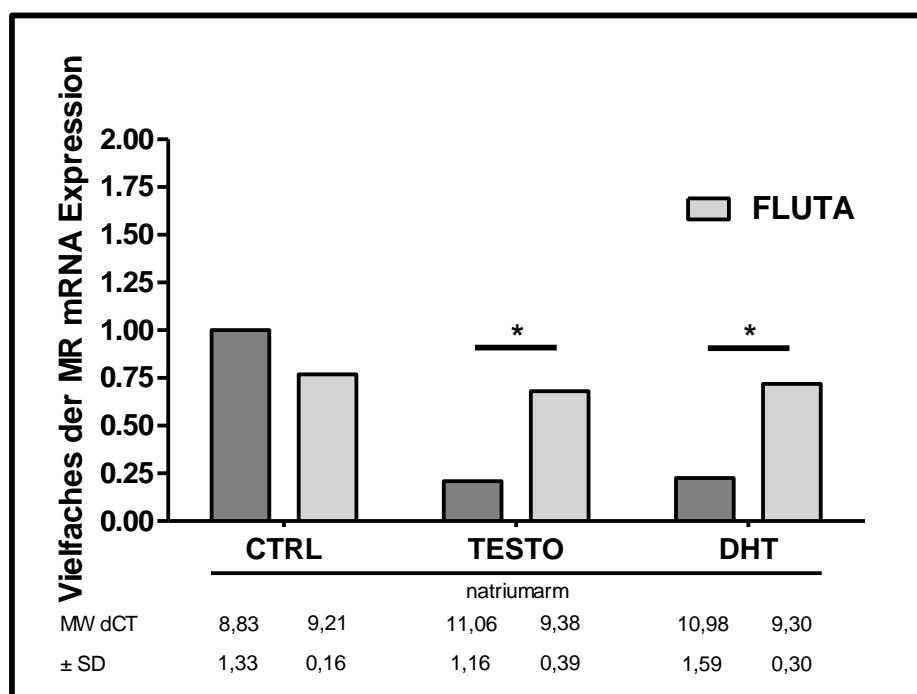


Abbildung 8: Vielfache Veränderung der kardialen mRNA Expression des Mineralokortikoidrezeptors in orchiektomierten männlichen Wistar-Ratten. FLUTA: Tiere mit zusätzlicher Injektion von 10,5 mg Flutamid. Kontroll-Tiere der natriumarmen Diät als Einfaches der Expression dargestellt. Mittelwert (MW), Standardabweichung (\pm SD). *: $p < 0,05$

Unter pharmakologischer Blockade des MR mittels zusätzlicher Gabe von Spironolacton zeigt sich ebenfalls ein das Bild einer Androgen-abhängigen Regulation (Abbildung 9). In den natriumarmen Behandlungsgruppen ergibt sich eine im Mittel um 26% niedrigere Expression für die Testosteron-behandelten Tiere bzw. um 21% niedrigere für DHT. Dieser Trend ist auch bei natriumreicher Nahrungsaufnahme zu erkennen mit einer im Mittel um 43% geringeren

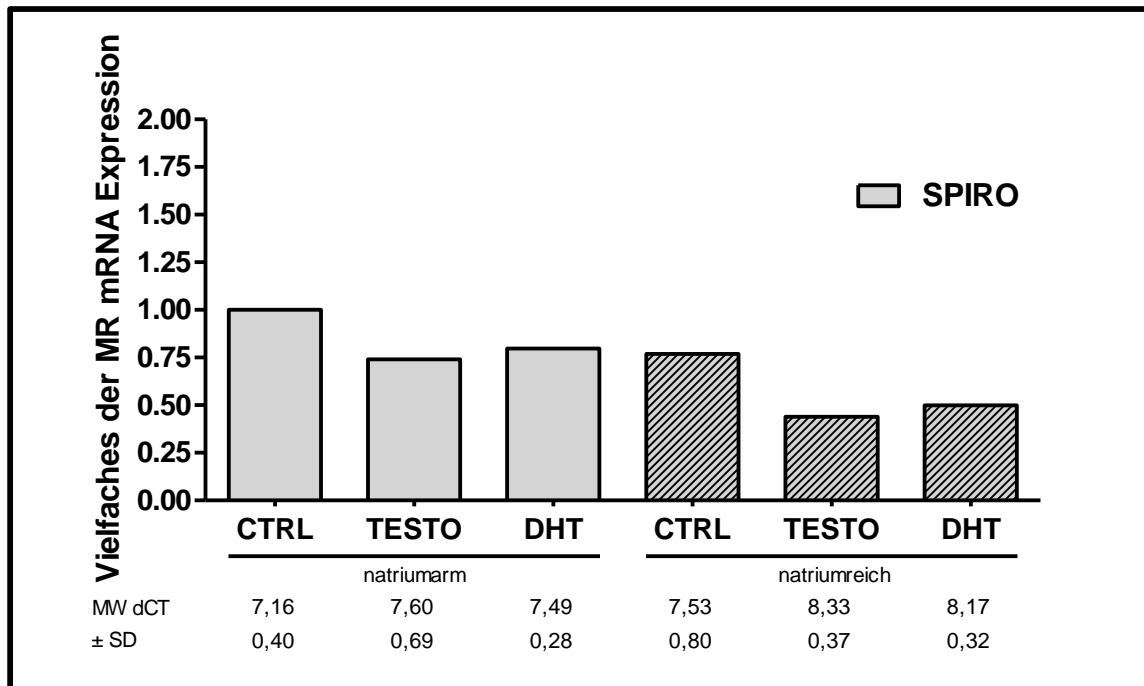


Abbildung 9: Vielfache Veränderung der kardialen mRNA Expression des Mineralokortikoidrezeptors in orchietomierten männlichen Wistar-Ratten unter zusätzlicher Injektion von 17,5 mg Spironolacton. Kontroll-Tiere der natriumarmen Diät als Einfaches der Expression dargestellt. Mittelwert (MW), Standardabweichung (\pm SD).

mRNA-Menge für die Testosteron-behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe der gleichen Diät. Auch die Behandlung mit DHT zeigt in diesem Zusammenhang einen ähnlich gerichteten Trend. Keiner der beschriebenen Trends unter zusätzlicher Gabe von Spironolacton erreichte jedoch ein statistisches Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Vergleicht man die Effekte von Flutamid und Spironolacton auf die Expression des MR, stellt man fest, dass die alleinige Gabe von Spironolacton zu einer reaktiven Hochregulation des Rezeptors führt. Dies war signifikant beim Vergleich mit den jeweilig entsprechenden Behandlungsgruppen und ist für die Kontrollgruppen der natriumarmen Behandlung in Abbildung 10 illustriert. Flutamid hingegen zeigte unabhängig von einer Androgenbehandlung keinen Effekt auf den Gehalt an für den MR kodierender mRNA.

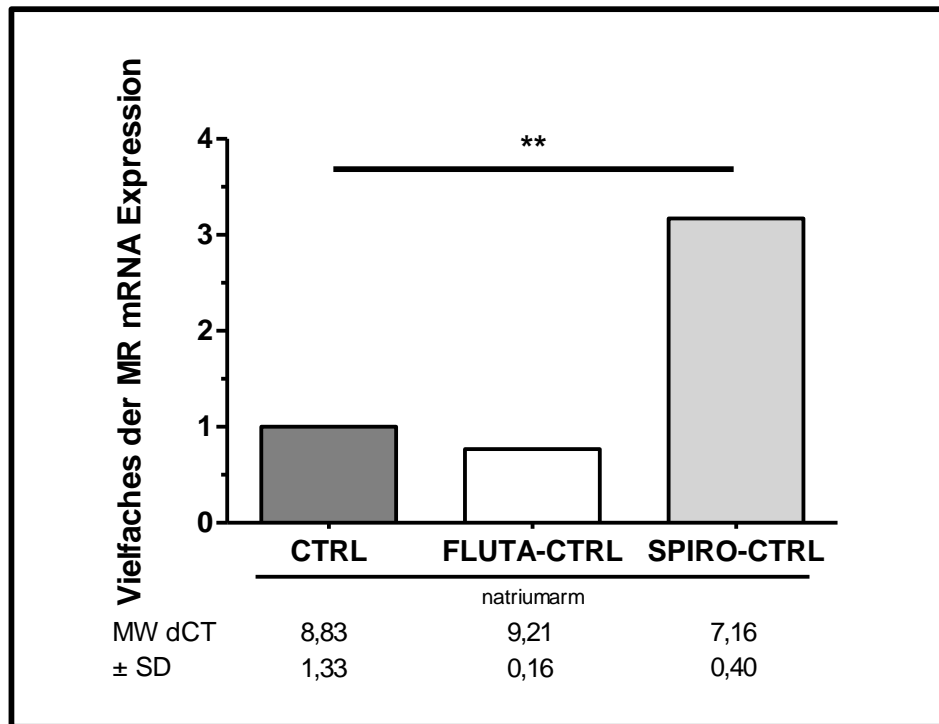


Abbildung 10: Vielfache Veränderung der kardialen mRNA Expression des Mineralokortikoidrezeptors in orchietomierten männlichen Wistar-Ratten unter zusätzlicher Injektion Spironolacton beziehungsweise Flutamid. FLUTA-CTRL: Tiere mit zusätzlicher Injektion von 10,5 mg Flutamid. SPIRO-CTRL: Tiere mit zusätzlicher Injektion von 17,5 mg Spironolacton. Kontroll-Tiere der natriumarmen Diät als Einfaches der Expression dargestellt. Mittelwert (MW), Standardabweichung (\pm SD). **: $p < 0,01$

4.4. Expression von Transforming growth factor- β_1 und Serum glucocorticoid-induced kinase 1

Um die Relevanz der Regulation des MR zu verifizieren, wurde weiterhin untersucht, inwiefern auch klassische Zielgene des MR nachfolgend beeinflusst werden. TGF- β_1 und SGK-1 sind in diesem Zusammenhang Proteine, welche durch aktivierten MR hochreguliert werden [109, 123]. Insofern wäre bei Repression des MR folglich eine verminderte Konzentration der Transkriptionsprodukte für TGF- β_1 und SGK-1 im Herzen zu erwarten.

In der Abbildung 11 ist die Expression von TGF- β_1 dargestellt, wobei zu erkennen ist, dass die Behandlung mit Androgenen wie erwartet auch die Expression dieses Zielgenes des MR in ähnlicher Weise beeinflusst wie den Rezeptor selbst. Auch hier führt die Gabe von Testosteron in der natriumarmen Behandlungsgruppe zu einer Herunterregulation auf das 0,21-fache der Expression ($p < 0,05$), DHT-Gabe zu einer

Expression, die 23% im Vergleich zur Kontrollgruppe entspricht ($p < 0,05$). Ebenso findet sich bei der natriumreichen Kontrollgruppe eine mRNA-Menge, die im Mittel 28% der Kontrolle unter Natriumrestriktion entspricht. Unter den bereits in dieser Gruppe erniedrigten Spiegeln von TGF- β_1 konnte die Androgengabe zu keiner weiteren, statistisch signifikanten Herunterregulation führen.

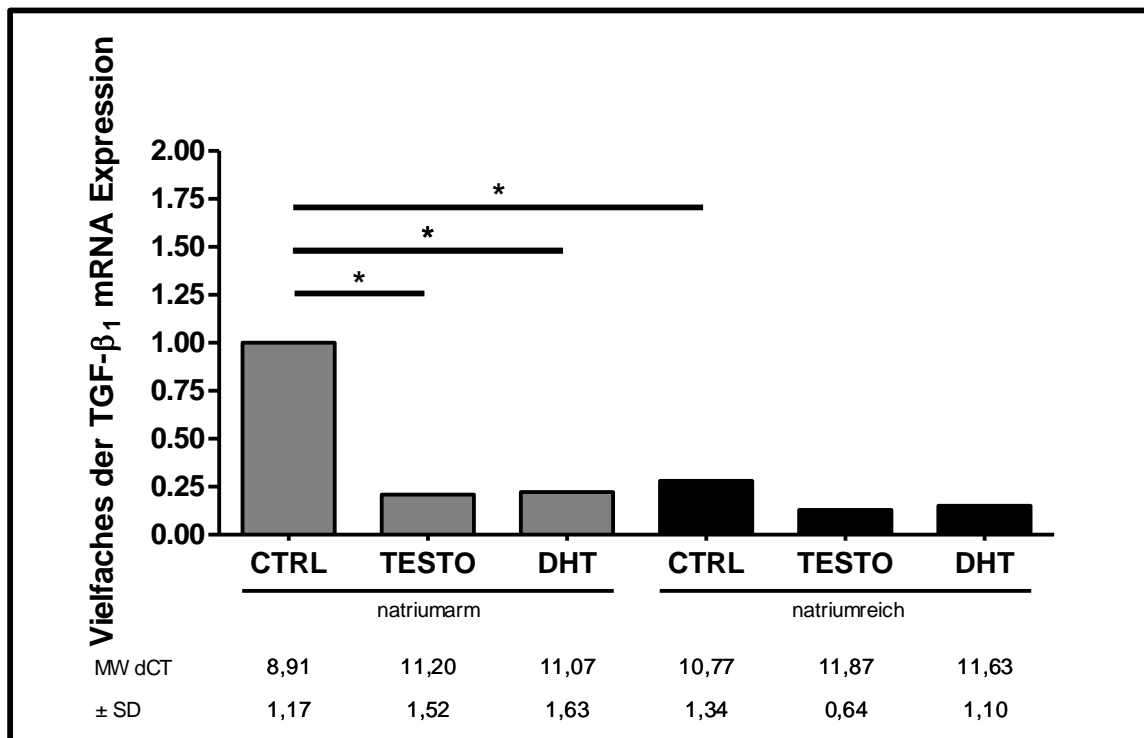


Abbildung 11: Vielfache Veränderung der kardialen mRNA Expression von TGF- β_1 in orchietomierten männlichen Wistar-Ratten. Kontroll-Tiere der natriumarmen Diät als Einfaches der Expression dargestellt. Mittelwert (MW), Standardabweichung (\pm SD). *: $p < 0,05$

Für SGK-1 verhielten sich die Effekte ähnlich, wenn auch nicht identisch. Hier konnte aufgrund der breiten Streuung der Messwerte innerhalb der Gruppen nur für die Stimulation mit Testosteron unter natriumarmer Diät eine statistische Signifikanz beobachtet werden (Abbildung 12). Die Konzentration an MR mRNA verhielt sich hier im Mittel 7,7-fach geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe. Jedoch ist auch unter gesteigerter Salzaufnahme ein Trend in Richtung geringerer Konzentration an mRNA für SGK-1 zu erkennen.

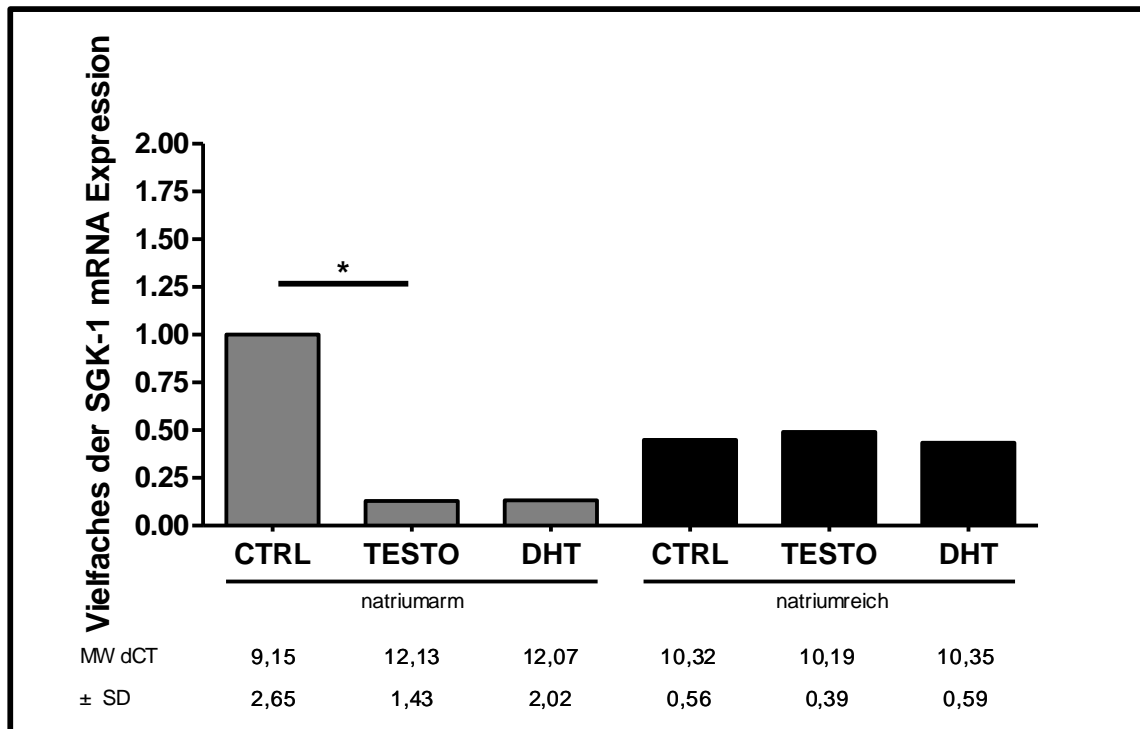


Abbildung 12: Vielfache Veränderung der kardialen mRNA Expression von SGK-1 in orchietomierten männlichen Wistar-Ratten. Kontroll-Tiere der natriumarmen Diät als Einfaches der Expression dargestellt. Mittelwert (MW), Standardabweichung (\pm SD). *: $p < 0,05$

4.5. *Proteinexpression des Mineralokortikoidrezeptors*

Zur weiterführenden Untersuchung wurden Western Blot-Studien für die Tiere der natriumarmen Behandlungsgruppen durchgeführt und nachfolgend densitometrisch quantifiziert. Der MR im Herzen konnte in vorangegangenen Arbeiten bei einer Größe von ca. 107 kDa identifiziert werden [124]. Bei vorliegenden Untersuchungen zeigten sämtliche Western Blots eine singuläre Bande bei ca. 80 kDa. Auch unter Verwendung unterschiedlicher Proteinstandards zeigte sich für den MR stets eine Bande unterhalb von 100 kDa. Weiterhin wurden mehrere verschiedene Primärantikörper getestet und hierbei stets ein spezifisches Signal auf derselben Höhe in der SDS-PAGE nachgewiesen.

Abbildung 13 zeigt die relative Expression des MR auf Proteinebene. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in den Tieren, welche mit Testosteron behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Western Blot konnte somit die Ergebnisse der Real-Time PCR nicht stützen. Stichproben für Tiere unter

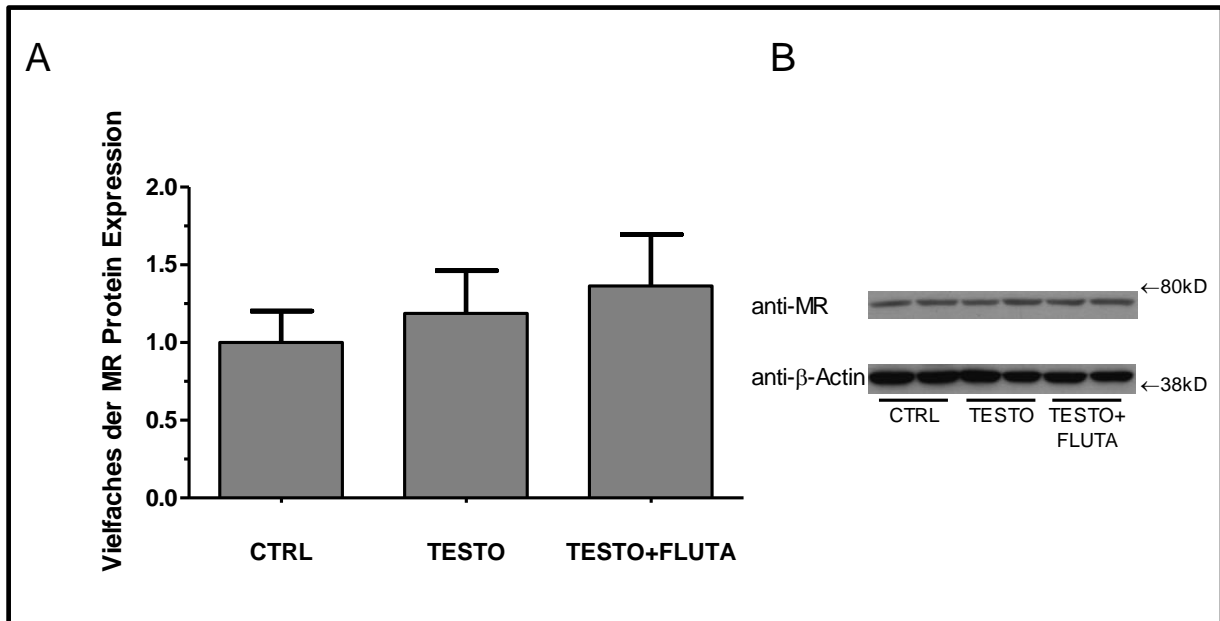


Abbildung 13: **A)** Vielfache Veränderung der kardialen Proteinexpression des Mineralokortikoidrezeptors in orchiektomierten männlichen Wistar-Ratten unter natriumarmer Behandlung (jeweils n=4). Ermittlung der relativen Proteinexpression durch Ratio MR:β-Actin. Kontroll-Tiere der natriumarmen Diät anschließend als einfaches der Expression dargestellt. Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung (\pm SD). **B)** Repräsentative Western Blots für MR und β-Actin (interne Kontrolle).

DHT-Stimulation zeigten ebenfalls keine optischen Unterschiede in Hinblick auf die Stärke der Bande, sodass auf eine weitere densitometrische Auswertung und Statistik verzichtet wurde. Pharmakologische AR-Blockade mit Flutamid übte ebenfalls keinen Effekt auf die Proteinexpression des MR aus.

4.6. Expression des Glukokortikoidrezeptors und der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1

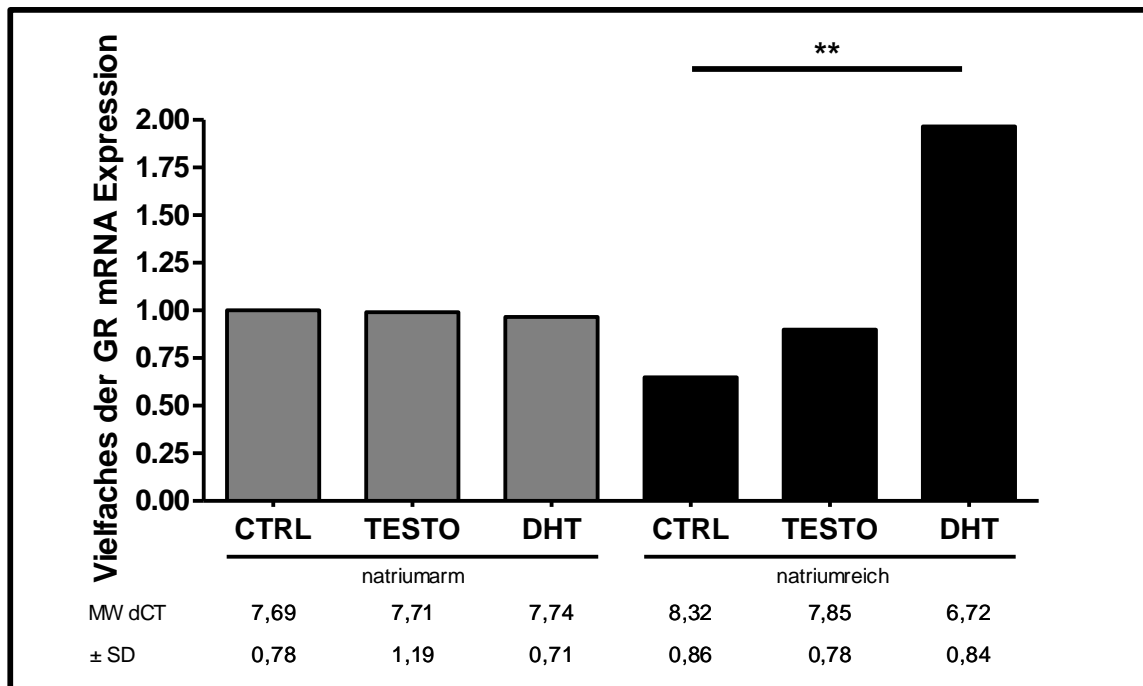


Abbildung 14: Vielfache Veränderung der kardialen mRNA Expression des Glukokortikoidrezeptors in orchiectomierten männlichen Wistar-Ratten. Kontroll-Tiere der natriumarmen Diät als Einfaches der Expression dargestellt. Mittelwert (MW), Standardabweichung (\pm SD). **: $p < 0,01$.

Abbildung 14 zeigt die relative Expression des GR unter den zuvor beschriebenen Behandlungsgruppen. Es zeigt sich lediglich bei DHT und unter gleichzeitiger natriumreicher Diät ein Effekt in Form einer erhöhten Menge an GR mRNA. Die Regulation folgt somit einem anderen Muster, als in den Messungen für den MR und dessen Zielgene bisher gesehen.

Auch sollte der Einfluss auf die 11 β -HSD1 auf Proteinebene für die natriumarme Behandlungsgruppe validiert werden. Repräsentative Western Blots zeigten keine sichere Regulation des Enzyms auf Proteinebene (Abbildung 15).

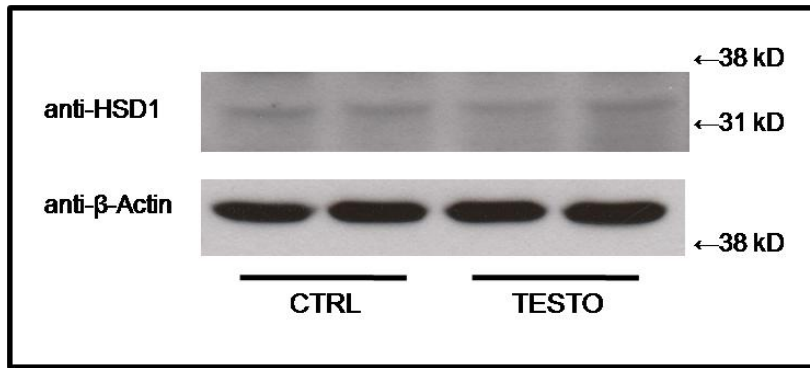


Abbildung 15: Repräsentative Western Blots mit kardialer Proteinexpression der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 in orchiektomierten männlichen Wistar-Ratten unter natriumarmer Behandlung; β -Actin als interne Kontrolle.

5. Diskussion

5.1. *In vivo Tiermodell und Androgenwirkungen*

Um den Einfluss von Androgenen auf das Herz zu untersuchen, sollte ein Tiermodell herangezogen werden, in dem Ratten zunächst gonadektomiert wurden und daraufhin eine Gabe von Androgenen beziehungsweise Placebo erfolgte. Die Wirkung der männlichen Sexualhormone ergibt sich somit aus dem Vergleich beider Gruppen. Bei kaum detektierbaren Spiegeln an Androgenen unter Placebo-Behandlung kann von einer erfolgreichen vorangegangenen Gonadektomie ausgegangen werden. Ein Unterschied der Konzentrationen an 17β -Estradiol fand sich nicht, jedoch muss eine lokale Konversion im Zielgewebe aus Testosteron als möglich angenommen werden [63]. DHT war sowohl in den Tieren der Testosteron- als auch in der eigentlichen DHT-Gruppe detektierbar. Dies ist erklärbar durch endogene Konversion von Testosteron in DHT durch 5α -Reduktase.

Entscheidend für die biologische Relevanz des Tiermodells ist eine Androgen-Substitution im physiologischen Bereich. Die Versuchstiere, welche mit Testosteron bzw. DHT behandelt wurden, zeigten im Serum einen Spiegel im supraphysiologischen Bereich im Vergleich zu adulten Vergleichstieren [125, 126]. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die letzte Injektion am Morgen der Tötung der Tiere mit nachfolgender Blutanalyse appliziert wurde. Die Dosis der injizierten Menge an Testosteron selbst ist mit anderen Arbeiten vergleichbar [127-130]. Es kann davon ausgegangen werden, dass bedingt durch die parenterale Gabe nach zeitlichem Abstand mit einem Abfall des Spiegels zu rechnen ist. Letztlich kann jedoch anhand der Serumspiegel an Testosteron allein eine Stimulation im supraphysiologischen Bereich nicht ausgeschlossen werden.

Zur Evaluation der biologischen Wirksamkeit hilft weiterhin eine Interpretation des Gewichts der Prostata. Hier zeigt sich in der Testosteron-behandelten Gruppe ein vergleichbares Gewicht mit geringfügiger Erniedrigung ohne biologische Relevanz. In den Gruppen unter DHT-Behandlung lässt sich jedoch ein überraschenderweise niedrigeres Gewicht im Vergleich zur TESTO-Behandlung feststellen. Beide Behandlungsgruppen erhielten die identische Dosis an Testosteron bzw. DHT (jeweils 2,86 mg/kg). Beschrieben ist eine erhöhte Wirksamkeit von DHT im Vergleich zu Testosteron, unter anderem bedingt durch eine erhöhte Affinität am AR

[64]. Jedoch gilt zu berücksichtigen, dass diese Eigenschaft *in vitro* demonstriert wurde und sich die letztendliche Wirkung im Gesamtorganismus unterscheiden kann. In einer Kohortenstudie mit hypogonadalen Männern, welche ausschließlich mit DHT substituiert wurden, konnte eine signifikant verringerte Prostatagröße sonographisch nachgewiesen werden [131]. Die trophischen Effekte von Androgenen auf die Prostata scheinen in diesem Zusammenhang auch von der Möglichkeit der lokalen Aromatisierung von Testosteron angewiesen zu sein. Auch tierexperimentell konnte demonstriert werden, dass bei ausschließlicher DHT-Substitution höhere Dosen im Vergleich zu Testosteron notwendig waren, um intraprostatisch potente Spiegel an DHT zu erreichen [132]. Dies scheint bedingt durch rasche Metabolisierung von DHT im Serum zu sein.

Letztlich zeigt sich zumindest für die Testosteron-behandelten Tiere anhand des Prostatagewichts der Ratten eine physiologische Substitution nach erfolgter Gonadektomie. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass dieser Parameter von eingeschränkter Aussagekraft ist und lediglich einen groben Anhalt geben kann.

5.2. Einfluss der nahrungsbedingten Salzzufuhr

Für Aldosteron ist eine Abhängigkeit der Hormonwirkung von der nahrungsbedingten Salzzufuhr gut etabliert und diese sollte auch für Testosteron und DHT untersucht werden [102, 133]. In vorliegender Arbeit wurde sich zu einem Versuchsaufbau mit salzreicher Diät entschlossen, welche den übermäßigen Salzkonsum in westlichen Populationen imitieren sollte [134]. Unter solch hoher Salzzufuhr kommt es physiologischerweise zu einer Suppression des RAAS. Andererseits konnte für die hier durchgeführte salzarme Diät in einer bereits veröffentlichten Arbeit demonstriert werden, dass es hierunter zu einer Aktivierung des RAAS mit erhöhten Serumspiegeln von Aldosteron kommt [121]. Klinisch ist ein übermäßiger Salzkonsum mit dem Auftreten einer arteriellen Hypertonie assoziiert, wobei eine restriktive Salzzufuhr den Blutdruck additiv zu einer gesunden Ernährung effektiv senken kann [135].

Zu einer Veränderung des Körpergewichts durch die jeweils durchgeführte Salzbehandlung kam es nicht. Das überschüssig zugeführte Natrium scheint somit zum überwiegenden Teil renal ausgeschieden bzw. wasserungebunden im Körper gespeichert worden zu sein [136]. Lediglich für die Tiere unter salzarmer Diät und

gleichzeitiger Testosterongabe zeigte sich eine signifikante Zunahme des Körpergewichts. In diesem Zusammenhang konnte für genau diese Tiere (Testosteron-behandelt unter natriumarmer Diät) eine Zunahme des arteriellen Blutdrucks im Vergleich zur Kontrolle nach Gonadektomie demonstriert werden [120]. Denkbar erscheint ein zugrunde liegender natriumretinierender Effekt von Testosteron unter restriktiver Salzaufnahme mit nachfolgender Erhöhung des intravasalen und extrazellulären Volumens und einer resultierenden Zunahme des arteriellen Blutdrucks sowie des Körpergewichts [120].

Es zeigte sich keine relative Regulation des kardialen AR unter salzreicher Nahrungszufuhr im Vergleich zur salzarmen Diät. Weiterhin ließ sich ebenfalls keine Veränderung der Expression unter zusätzlicher Gabe von Testosteron beziehungsweise DHT nachweisen. Entsprechend ist eine Regulation des AR durch Natriumzufuhr bislang nicht beschrieben worden. Das lokale Androgensystem im Herzen der Ratte scheint somit unabhängig von der jeweiligen Salzbehandlung zu sein.

In Hinblick auf den MR ergab sich jedoch ein anderes Bild. Hier zeigten die Tiere in der salzreichen Behandlungsgruppe und Androgendefizienz eine relative Herunterregulation des MR. Dies steht in Einklang mit einer physiologischen Suppression des RAAS unter Salzexzess mit Linksverschiebung der Druck-Natriurese-Kurve. Erwartungsgemäß ergibt sich demnach eine Suppression der Aldosteronspiegel im Serum unter natriumreicher Behandlung für die hier behandelten Tiere [121]. Die verminderte Expression des MR kann somit möglicherweise als physiologische Antwort auf die supprimierten Aldosteronspiegel im Sinne einer positiven Autoregulation gewertet werden. Dies steht im Gegensatz zu einer Untersuchung von Richiutti et. al., bei denen in Ratten mit einer salzreichen Behandlung der kardiale MR eine erhöhte Expression im Vergleich zur natriumarmen Kontrollgruppe zeigte [137]. In vorliegender Arbeit wurden jedoch die unterschiedlichen Salzdiäten für 25 anstelle von 6 Tagen durchgeführt. Es erscheint möglich, dass durch den längeren Behandlungszeitraum adaptive Prozesse als Antwort auf potentiell schädliche Effekte durch vermehrte MR-Expression in Gang gesetzt werden. Darüber hinaus handelte es sich in der Arbeit von Richiutti et al. um intakte Tiere ohne zuvorige Gonadektomie. Vergleicht man jedoch die Androgen-substituierten Tiere unter salzarmen beziehungsweise -reicher Diät, zeigt sich in vorliegender Arbeit lediglich ein nicht signifikanter Trend zur Herunterregulation. Die

am ehesten mit der Arbeit von Richiutti et al. vergleichbaren Tiere zeigten folglich keine signifikante Regulation. Wie bereits erwähnt, geht die Natriumrestriktion mit erhöhten Aldosteronspiegeln einher. In Geweben des distalen Kolons, der Niere oder des Herzens kommt es ebenfalls zu keiner Autoregulation des MR nach Gabe von Aldosteron [138, 139].

5.3. Autoregulation des Androgenrezeptors

Die Expression des AR konnte sowohl im menschlichen Herzen als auch im Herz der Ratte nachgewiesen werden [37]. In dieser Arbeit kann keine Autoregulation im Herzen nach Androgengabe auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Die vorliegenden Ergebnisse stehen in Einklang mit der Tatsache, dass bisher keine Autoregulation im Herzen beziehungsweise in Kardiomyozyten beschrieben ist. Es sei jedoch verwiesen auf die prinzipielle Möglichkeit von ligandenabhängigen posttranslationalen Modifikationen, welche die Expression auf Proteinebene bei unverändertem mRNA-Gehalt erhöhen, beispielsweise durch Erhöhung der Rezeptorstabilität.

In klassischen Zielorganen von Androgenen ist die Autoregulation des AR ausgesprochen gewebs- und zellspezifisch. In der Prostata männlicher Mäuse und Ratten kommt es jedoch nach Gonadektomie zur verminderten AR-Expression, welche sich nach Testosterongabe normalisierte [140]. Auch im Hippocampus zeigt sich nach Gonadektomie ein Abfall des Gehalts an AR mRNA im Sinne einer positiven Autoregulation [141, 142]. Ebenfalls resultierte die Stimulation von genitalen Fibroblasten der Haut mit DHT in einer Hochregulation des AR *in vitro* [143]. Auch in kultivierten Osteoblasten führt die Gabe von DHT zu einer Stimulation der AR-Expression [144]. Hingegen demonstrierten Quarmby et al. einen Anstieg der relativen mRNA in der Prostata von Ratten nach Kastration sowie in der Prostata-Zelllinie LNCaP im Northern Blot [145]. Auch in der Brustkrebs-Zelllinie T47D führte eine Androgenexposition zur verminderten Expression des AR, ohne hingegen einen Effekt auf Fibroblasten der extragenitalen Haut zu haben [146]. Es zeigt sich also ein heterogenes Bild für eine Autoregulation des AR. Unterschiede erklären sich teilweise durch die jeweils eingesetzten Untersuchungsmethoden sowie durch die Zellspezifität der Autoregulation.

5.4. Charakterisierung der Androgen-abhängigen Regulation des Mineralokortikoidrezeptors und abhängiger Gene

5.4.1. Androgen-abhängige Regulation des Mineralokortikoidrezeptors

Die Untersuchung einer Androgen-abhängigen Regulation des MR sollte Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit sein. Diese ist bisher nicht beschrieben und auch in anderen Geweben nicht vorbekannt.

Die Bestimmung der MR-Expression konnten eine Herunterregulation auf mRNA-Ebene unter Androgen-Substitution demonstrieren. Hierbei zeigten Testosteron und DHT eine vergleichbare Wirksamkeit. Die Effekte waren in der salzarmen Behandlung ausgeprägter und konnten nur hier statistische Signifikanz erreichen. Unter zusätzlicher Gabe von Flutamid ließen sich die Wirkungen von Testosteron und DHT aufheben, was für einen AR-vermittelten Effekt spricht. Androgene scheinen somit spezifisch den MR unter natriumarmer Diät auf mRNA-Ebene herunter zu regulieren. Es scheint jedoch möglich, dass auch unter salzreicher Behandlung mit einer größeren Gruppengröße eine signifikante Herunterregulation hätte nachgewiesen werden können.

In Hinblick auf die Proteinexpression des MR wurde die Gruppe der salzarm behandelten Tiere untersucht, in denen zuvor die signifikante mRNA-Regulation nachgewiesen wurde. Hier konnten die Ergebnisse des Western Blots die Messungen der quantitativen Real-Time PCR nur teilweise stützen. Eine Regulation nach Testosterongabe zeigte sich nicht, jedoch auch keine Änderung unter zusätzlicher Flutamid-Gabe. Die Interpretation der Western Blots gestaltete sich schwierig, da das Molekulargewicht der detektierten Bande von circa 80 kDa nicht der vorbekannten Größe des MRs und seiner Splice-Varianten entspricht (circa 107 kDa). Trotz hoher Sorgfalt bei der Probenverarbeitung erscheint ein partiell-degradierter MR eine mögliche Erklärung für die kleinere Größe des nachgewiesenen Proteins. Die ausgesprochene Instabilität des MR ist durch Gomez-Sanchez et al. bereits demonstriert worden [124]. In vorliegender Arbeit kamen ausschließlich die in der Publikation etablierten Antikörper zum Einsatz. Zusammenfassend konnte die Regulation des MR auf Proteinebene, wahrscheinlich methodisch bedingt, nicht nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit zeigt sich unter gleichzeitiger Gabe von Spironolacton ebenfalls eine Abschwächung der Androgen-abhängigen Regulation des MR in der Real-Time PCR. Auch die relative Expression unter zusätzlicher Gabe von Spironolacton war im Vergleich zur Hauptbehandlungsgruppe ohne Spironolacton erhöht, was als Reaktion auf die pharmakologische Blockade gewertet werden kann. In pathologischen Situationen wie nach akutem Myokard-Infarkt können Antagonisten des MR hingegen dessen Hochregulation im Tiermodell reduzieren [147].

Die abgeschwächte Wirkung von Testosteron und DHT unter gleichzeitiger Gabe eines MR-Antagonisten kann durch die antiandrogene Wirkkomponente von Spironolacton bedingt sein [148]. Eplerenon hingegen zeigt als selektiver MR-Antagonist keine signifikante Aktivität am AR [149]. In diesem Zusammenhang konnte Testosteron in einer Arbeit durch Sanchez-Mas et al. die durch hyperosmolaren Stress induzierte Apoptose in H9c2-Zellen verringern [150]. Interessanterweise wurden diese Effekte in gleicher Arbeit durch Spironolacton, nicht jedoch durch Eplerenon, aufgehoben. Dies unterstreicht die mögliche Bedeutung Androgen-antagonistischer Nebeneffekte von Spironolacton, wenn auch die verwendeten Dosierungen nicht vergleichbar sind.

Der Grad der Expression des MR spielt in verschiedenen pathophysiologischen Situationen eine bedeutende Rolle. So zeigt sich eine erhöhte Proteinexpression für den MR im Rattenmodell nach akutem Myokardinfarkt oder in Herzen von Ratten mit diastolischer Herzinsuffizienz [151, 152]. Auch in humanen Präparaten von herzinsuffizienten Patienten ließ sich eine kardiale Hochregulation im Vergleich zu kardial nicht vorerkrankten Kontrollen gleichen Alters nachweisen [153]. Unklar bleibt jedoch, ob die Hochregulation des MR Grundlage oder Folge der pathologischen Anpassungs- und Umbauprozesse im Herzen ist.

Zur weiterführenden Untersuchung der funktionellen Bedeutung des MR dienen beispielsweise Knockout-Tiermodelle. Selektive Ausschaltung des MR-Gens in Kardiomyozyten schützt im Herzinsuffizienzmodell von Mäusen vor der Ausbildung von linksventrikulärer Dilatation und führt zu einer verbesserten kardialen Pumpfunktion [154]. Die Ausschaltung des MR in Kardiomyozyten scheint sich somit vor allem auf hämodynamische Parameter positiv auszuwirken, jedoch nicht auf die induzierte Apoptose und kardiale Fibrose [154]. Diese Prozesse könnten über Monozyten beziehungsweise Makrophagen vermittelt werden [155].

Es existieren jedoch auch Tiermodelle, die einen schädlichen Effekt einer verminderten MR-Expression demonstrieren konnten. In einer Arbeit von Begga et al. entwickelten Mäuse mit selektiver Suppression der kardialen MR-Expression Zeichen einer dekompensierten Herzinsuffizienz zusammen mit einer ausgeprägten Fibrose [156]. Hierbei unterschied sich jedoch die methodische Herangehensweise, da bei einem konditionellem Knockdown eine Interaktion der in Kardiomyozyten exprimierten Antisense-RNA mit anderen Rezeptoren oder Schlüsselproteinen nicht ausgeschlossen werden kann. Darüber hinaus gilt außerdem zu bedenken, dass in dem Mausmodell von Begga et al. der Grad der endogenen Aktivierung des MR durch das RAAS nicht berücksichtigt wurde. Die verminderte Expression wurde im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit nicht von vergleichsweise hohen Serumspiegeln an Aldosteron begleitet.

Letztlich kann bedingt durch die Testosteron-abhängige Herunterregulation des MR im Herzen der Ratte ein geschlechtsspezifischer Mechanismus in Bezug auf pathologische Prozesse des kardiovaskulären Systems postuliert werden. Aldosteron und der MR gehören gemeinsam zur Endstrecke des RAAS, wobei sich eine Reihe von Besonderheiten zwischen Männern und Frauen in Bezug auf dessen Aktivität demonstrieren lassen. In einem Rattenmodell zum Herzinfarkt zeigten sich geschlechtsspezifische Unterschiede in der Blockade des MR mit Eplerenon, welche auch Auswirkungen auf echokardiographische Parameter hatten [157]. In dieser Arbeit zeigte sich ausschließlich bei weiblichen Tieren eine signifikante Verbesserung der LVEF unter Eplerenon. So haben auch Estrogene einen Einfluss auf das kardiovaskuläre System und können so für die Geschlechterdisparität mitverantwortlich sein. Estrogenrezeptor-Agonisten beeinflussen hierbei auch das Aldosteron-induzierte linksventrikuläre Remodelling und die kardiale Fibrose günstig [158].

5.4.2. Regulation von *Serum Glucocorticoid-induced kinase 1* und *Transforming growth factor- β_1*

Zur weiterführenden Charakterisierung der Androgen-abhängigen Regulation des MR sollte der Grad der Expression von Zielgenen des Rezeptors untersucht werden. SGK-1 ist in epithelialen Geweben wie Niere und Kolon ein zentrales Protein der Signaltransduktion, dessen Expression unmittelbar durch an Aldosteron gebundenen

MR potenziert wird [159]. Auch im Herz von Ratten sowie in *in vitro*-Studien an Kardiomyozyten wurde eine Hochregulation auf mRNA-Ebene nach Aldosteron-Gabe demonstriert [106, 123]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Regulation, welche sich weitgehend kongruent zur Expressionsänderung des MRs verhielt. Große Schwankungen innerhalb der Kontrollgruppe der natriumarmen Behandlung bedingten, dass die Veränderung der relativen Expression in den DHT-behandelten Tieren keine statistische Signifikanz erreichte. Androgene selbst zeigten in einer Prostata-Zelllinie hingegen eine entgegengesetzte Regulation von SGK-1 im Vergleich zur vorliegenden Arbeit [160]. Folglich kann die Veränderung des relativen Grades an mRNA für SGK-1 als indirekte Folge der Androgen-bedingten Herunterregulation des MR interpretiert werden. Als Hauptmediator des Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalweges könnte SGK-1 somit eine zentrale Rolle bei der Vermittlung nachfolgender intrazellulärer Effekte zukommen. Es reguliert beispielsweise Elektrolytein- und -ausstrom in Kardiomyozyten und begünstigt die Entstehung einer kardialen Hypertrophie sowie Herzinsuffizienz [106, 110].

TGF- β_1 zeigte ebenfalls eine signifikante Herunterregulation nach Androgen-Substitution in den salzarmen Behandlungsgruppen. TGF- β_1 ist ein wichtiger Marker für myokardiale Fibrose und Hypertrophie. TGF- β_1 konnte in VSMC durch Aldosteron hochreguliert werden, wobei die Effekte MR-vermittelt waren [109]. Es erscheint jedoch auch möglich, dass die verminderte Expression eher der Wirkung von Testosteron und DHT zuzuschreiben ist, als dass es sich um eine indirekte Folge der verminderten MR-Expression handelt. Im Prostatagewebe von Ratten ließ sich ein inhibitorischer Einfluss von Androgenen auf die Expression von TGF- β demonstrieren [161]. Hierbei enthält die Promotoren-Region des Gens für TGF- β_1 sowohl positive als auch negative AREs, welche funktionelle Aktivität zeigen [162, 163]. Die letztliche Richtung der Regulation durch Androgene scheint somit vom Zelltyp abhängig zu sein und auch eine Hochregulation ist möglich [164]. In vorliegender Arbeit erklärt eine direkte Regulation durch Testosteron und DHT jedoch nicht die Veränderung des Expressionsgrades beim Vergleich beider Kontrollgruppen ohne androgene Stimulation. Auch ist bisher nur im Rahmen eines Herzinsuffizienzmodells eine Hochregulation dieses parakrinen Fibrosemediators durch Androgene beschrieben [165]. Die in vorliegender Arbeit beobachtete Herunterregulation von TGF- β_1 unter erhöhter Natriumzufuhr steht im Gegensatz zu einer Arbeit durch Yu et al., bei der exzessive Salzzufuhr im Rattenmodell zur

Zunahme von kardialem TGF- β_1 führt [166]. Diese Arbeit unterschied sich jedoch von der vorliegenden durch eine höhere Salzzufuhr und einen deutlich längeren Behandlungszeitraum.

5.5. Regulation des Glukokortikoidrezeptors

In Hinblick auf die Möglichkeit einer Rezeptordimerisierung von Mineralo- und Glukokortikoidrezeptor war auch die relative Expression des GR von Interesse. Seine pathophysiologische Rolle im Herzen ist ambivalent. *In vitro* ließen sich in Kardiomyozyten sowohl hypertrophe Effekte einerseits, als auch anti-apoptotische Wirkungen andererseits demonstrieren [167]. In einem Rattenmodell, in dem Tiere mit dem potenten Mineralokortikoid Desoxycorticosteronacetat und zusätzlich salzreicher Diät behandelt wurden, zeigt der GR und dessen Blockade mit RU486 jedoch keinen Einfluss auf die resultierende kardiale Inflammation und Fibrose [116]. Es zeigte sich ein grundsätzlich anderes Regulationsverhalten unter Gabe von Androgenen. Hier resultierte lediglich die Gabe von DHT bei Tieren der salzreichen Diät in einer Hochregulation des kardialen GR. In Hinblick auf die Wirkungspotenz von Androgenen im Herzen ergaben sich in Anbetracht der vorhergehenden Ergebnisse dieser Arbeit keine Unterschiede zwischen Testosteron und DHT. Es besteht lediglich für DHT eine stimulierende Wirkung auf den Gehalt an mRNA des GR, nicht jedoch für Testosteron. Dies könnte erklärbar sein durch einen potentiell entgegengesetzten Effekt von intrakardial aus Testosteron gebildetem Estradiol, welches jedoch systemisch im Blut nicht nachweisbar war. Beide Effekte würden sich letztlich aufheben, sodass ausschließlich das nicht-aromatisierbare DHT eine Geninduktion zeigt. Die salzreiche Behandlung ist hierbei Voraussetzung für den Effekt, wobei es beispielsweise über erhöhte Natriumkonzentrationen zu intrazellulär vermehrtem oxidativen Stress kommen könnte [168]. Die möglicherweise lokal aus Testosteron gebildeten Estrogene hingegen vermindern im Mausmodell männlicher Tiere oxidativen Stress und myokardiale Apoptose [169]. Die Hochregulation des GR unter DHT wäre dann also als kompensatorischer Teil einer inflammatorischen Reaktion zu werten. Letztlich bleibt dies jedoch nur ein spekulativer Erklärungsansatz für eine DHT-abhängige Hochregulation des GR, ohne dass eine Messung von reaktiven Sauerstoffverbindungen an den untersuchten Geweben durchgeführt wurde.

In anderen Arbeiten konnte hingegen nach Gabe von DHT eine lokal verminderte Konzentration von GR mRNA im Hippocampus beziehungsweise im fetalen Lungengewebe von Ratten nachgewiesen werden [170, 171]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind unklar. Eine Regulation im Herzen, insbesondere unter Berücksichtigung der zugeführten Salzmenge, ist bisher nicht beschrieben worden.

5.6. Mögliche zugrunde liegende Mechanismen und Interaktionen der regulierten Gene

Die bisher nicht beschriebene Androgen-abhängige Regulation des MR lässt die Frage nach den zugrunde liegenden molekularen Mechanismen aufkommen. Ein funktionelles ARE ist innerhalb der Promotoren-Region des MR-Gens bisher nicht identifiziert worden. Jedoch wäre auch eine indirekte Regulation über vorgeschaltete Faktoren denkbar. In diesem Zusammenhang wurde durch unsere Arbeitsgruppe in der salzarmen Behandlung eine Androgen-abhängige Regulation der 11 β -HSD1 auf mRNA-Ebene nachgewiesen (bisher unveröffentlicht). Somit könnte die verminderte MR-Expression auch kompensatorische Folge einer gesteigerten intrazellulären Verfügbarkeit an Kortisol sein. Die Ergebnisse der durchgeführten exemplarischen Western Blots ergaben jedoch keine Hinweise einer relevanten Regulation auf Proteinebene. Auch der mit dem MR in funktioneller Verbindung stehende GR scheint in Hinblick auf dessen eigene Regulation die Expressionsänderung des MR und SGK-1 nicht erklären zu können. Letztlich bleiben die molekularen Mechanismen, auf denen die Androgen-abhängige Regulation des MR beruht, unklar.

SGK-1 als zentrales Molekül der intrazellulären Signaltransduktion in Kardiomyozyten weist eine Reihe von Interaktionen mit weiteren Schlüsselproteinen auf. Es nimmt die Position eines Schlüsselregulators von NF κ B ein und dieses wiederum wirkt auf die Expression von CTGF [172]. Relevant scheint dies unter inadäquaten Aldosteronspiegeln, bei denen die Entstehung von kardialer Fibrose SGK-1-abhängig ist und CTGF involviert [113]. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, reguliert SGK-1 auch den Natriumeinstrom in Kardiomyozyten und die Aktivität des transmembranären Na⁺/H⁺-Austauschers [110, 111]. SGK-1 könnte somit das Auftreten von malignen Arrhythmien bzw. Hypertrophie und Herzinsuffizienz begünstigen.

Auch die Expression von SGK-1 und TGF- β_1 könnten sich gegenseitig bedingen. So erwies sich TGF- β_1 *in vitro* als Induktor der SGK-1-Expression in immortalisierten Zelllinien intestinaler Abstammung [173]. Im Herzen ist dieser Effekt jedoch bisher nicht nachgewiesen worden. Abbildung 16 fasst die möglichen Interaktionen und deren pathophysiologische Bedeutung zusammen.

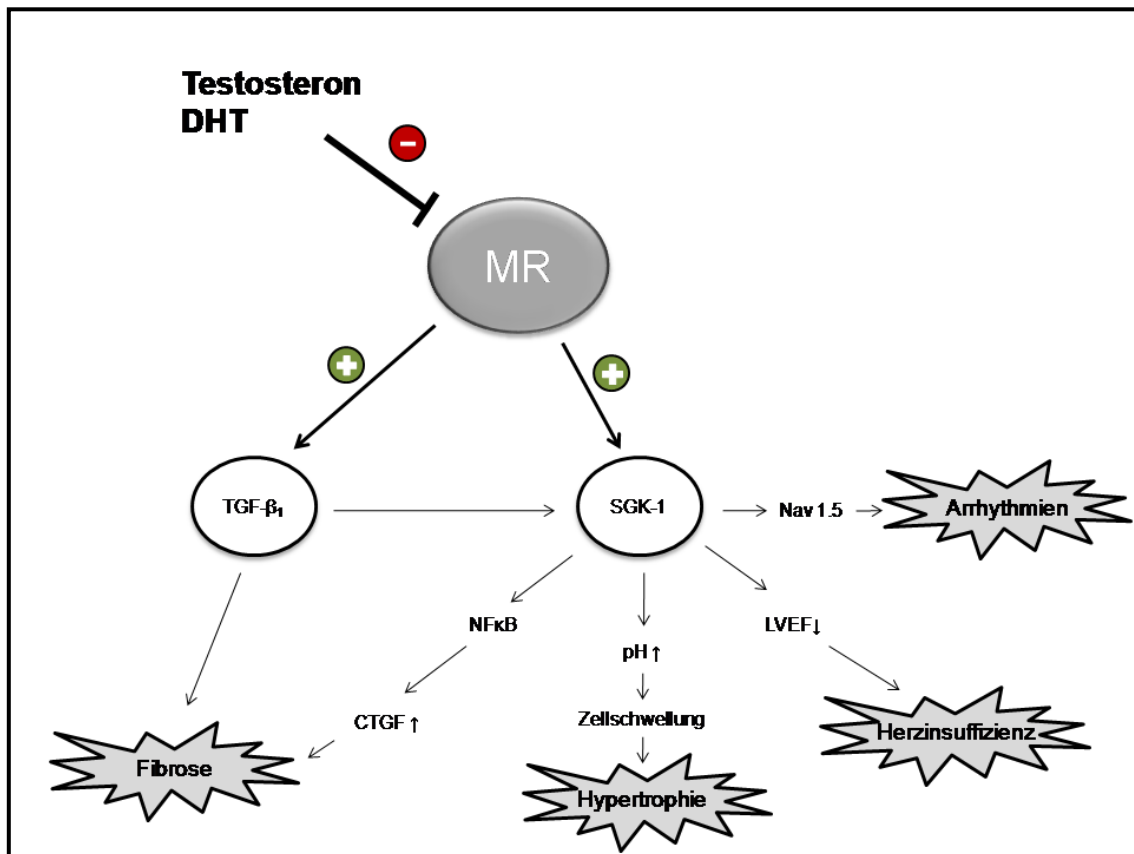


Abbildung 16: Schematische Darstellung der möglichen Interaktion beteiligter Signalmoleküle bei Androgen-abhängiger Regulation des Mineralokortikoidrezeptors. Testosteron und DHT führen hierbei zur verminderten Expression des MR mit nachfolgend verminderter Aktivierbarkeit pathophysiologische Signalwege [110, 111, 172]. CTGF - *Connective tissue growth factor*, DHT – Dihydrotestosteron, LVEF - linksventrikuläre Ejektionsfraktion, NFκB - *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*, SGK-1 - *Serum glucocorticoid-induced kinase 1*, TGF- β_1 – *Transforming growth factor- β_1* , Nav 1.5 – kardialer Natriumkanal

5.7. Mögliche klinische Bedeutung der vorliegenden Arbeit

In westlichen Populationen zeigt sich heutzutage eine übermäßige Zufuhr an Natrium, welche weit über der empfohlenen Zielmenge von circa 100 mmol/Tag (äquivalent zu 5,8 g NaCl) liegt [135]. Der MR ist hierbei phylogenetisch in an Land lebenden Organismen zur Regulation des Elektrolythaushalts unter eingeschränkter Verfügbarkeit von Natrium entstanden. In der westlichen Zivilisation hingegen ist Salz uneingeschränkt verfügbar und wird vor allem in industriell verarbeiteten Lebensmitteln großzügig eingesetzt. So zeigte sich in einer Querschnittstudie zum Salzkonsum einer US-amerikanischen Population, dass 90,7 % der Teilnehmer \geq 20 Jahre eine Einnahme oberhalb der empfohlenen Höchstmenge angab [134]. Es gibt Hinweise, dass ein erhöhter Salzkonsum nicht nur die Entstehung einer arteriellen Hypertonie begünstigt, sondern auch mit dem Vorkommen einer koronaren Herzerkrankung in Verbindung steht [174, 175]. Insgesamt scheint der menschliche Organismus nicht auf die übermäßige Salzzufuhr ausgerichtet zu sein, wobei ein Teil der Menschen die beschriebenen negativen Auswirkungen entwickelt. In einer großen Interventionsstudie an chinesischen Probanden zeigten insbesondere Patienten mit metabolischem Syndrom ein besonders häufiges Auftreten einer salzsensitive Hypertonie [176]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine natriumarme Diät eingesetzt, die umgerechnet auf einen Menschen mit einem Gewicht von 75 kg einer täglichen Zufuhr von circa 1 g NaCl/Tag entsprechen würde. Diese wiederum entspricht in etwa der für Risikogruppen empfohlenen maximalen Salzzufuhr von 1,5 g durch die *Dietary guidelines for Americans 2010*. Festzuhalten ist also, dass die natriumarme Behandlung einem angestrebten Salzkonsum in etwa entspricht, jedoch in der westlich-zivilisierten Welt kaum in der Realität anzutreffen ist.

Es gibt bisher keine ausreichende Evidenz in Hinblick auf eine Empfehlung für eine minimale Salzzufuhr. Trotzdem zeigt eine Reihe von Arbeiten auch eine erhöhte Morbidität und Mortalität unter ausgeprägter Salzrestriktion. So konnte eine Kohortenstudie bei hypertensiven Männern mit geringer Natriumausscheidung eine Risikoassoziation zur Entwicklung eines akuten Myokardinfarktes aufzeigen [177]. Auch eine Längsschnittstudie konnte eine erhöhte kardiovaskuläre Mortalität in Patienten mit niedriger Natriumexkretion demonstrieren [178]. Aus diesem Grund wird eine erhöhte Mortalität auf beiden Extremen des Salzkonsums in Form eine J-förmigen Verteilung von einigen Autoren angenommen [178, 179]. Es muss jedoch an dieser Stelle erwähnt werden, dass es sich hierbei zum größten Teil um

Beobachtungsstudien mit retrospektiver Betrachtung und hoher Fehleranfälligkeit handelte. Es existieren wenige, eher kleine, randomisierte kontrollierte Studien, welche in einer Metaanalyse durch Taylor et al. untersucht wurden. Hier zeigte sich kein Einfluss einer salzarmen Diät in Hinblick auf Mortalität und kardiovaskuläre Ereignisse [180]. Jedoch konnte für Patienten mit nicht-dekompensierter Herzinsuffizienz unter diuretischer Therapie in einer randomisierten kontrollierten Studie eine erhöhte Rate an Re-Hospitalisierung und Mortalität in der salzarmen Behandlungsgruppe nachgewiesen werden [181]. Hierbei muss jedoch die relativ kleine Größe der Studienpopulation bedacht werden sowie die Tatsache, dass die Patienten unter hoher Dosis an Schleifendiuretika bei gleichzeitig stark eingeschränkter Trinkmenge standen. Eine unter diesen Umständen aufgetretene Beeinträchtigung der Organperfusion durch eine salzarme Diät könnte so die erhöhte Re-Hospitalisierungsrate verursacht haben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Hinweise auf eine Androgen-abhängige Regulation in eben dieser experimentellen, salzarmen Umgebung. Die verminderte Expression des MR sowie TGF- β_1 und SGK-1 vermag so in pathologischen Situationen wie im Rahmen einer Herzinsuffizienz oder koronaren Herzerkrankung von prognostischer Bedeutung sein. Die pathologische Aktivierung des MR könnte durch Testosteron und DHT abgeschwächt werden. Bisher zeigte sich lediglich eine Assoziation zwischen einem laborchemischen Androgenmangel und der klinischen Ausprägung sowie der Prognose einer Herzinsuffizienz [48]. Die Regulation des MR würde so einen Teil eines kausalen Mechanismus für die kardialen Auswirkungen eines Androgenmangels aufzeigen. Dieser war von signifikanter Ausprägung jedoch nur unter Natriumrestriktion und somit nicht der realen Ernährungssituation unserer Gesellschaft entsprechend. Dies wäre eine mögliche Erklärung, warum bisherige klinische Studien keinen positiven Effekt einer Androgengabe bei Männern mit Herzinsuffizienz auf objektivierbare Parameter wie die echokardiographische Pumpfunktion ergaben [55]. Der Effekt wäre unter gängigem Salzkonsum schlichtweg zu schwach, um klinische Relevanz zu erreichen.

Auf der anderen Seite liegen in einer supraphysiologischen Testosterongabe Gefahren. So besteht unter inadäquat hohen Dosen an anabolen Androgenderivaten unter anderem ein erhöhtes Risiko für linksventrikuläre Hypertrophie, Dyslipoproteinämie, Koronarspasmen sowie maligne Arrhythmien [182]. In einer randomisierten kontrollierten Studie zur Testosteron-Substitution in älteren,

multimorbiden Männern konnte Basaria et al. eine Zunahme an kardiovaskulären Ereignissen und Hospitalisierungen in der Testosteron-behandelten Gruppe nachweisen [22]. In dieser Subpopulation, welche repräsentativ für hypogonadale Männer mit kardialen Vorerkrankungen ist, konnte keine ausreichende Sicherheit einer Testosterongabe demonstriert werden. Jedoch kann auch hier die höhere Dosierung an Testosteron einen maßgeblichen Einfluss gehabt haben. Androgene konnten so in einem Kontinuum an kardialen Effekten schädliche Wirkungen sowohl in Zuständen der Androgendefizienz als auch in supraphysiologischen Dosen hervorrufen. In vorliegender Arbeit hingegen konnte ein potentiell protektiv wirkender Mechanismus am Herzen aufgedeckt werden.

5.8. Limitationen der Arbeit

Zunächst einmal bietet die vorliegende Arbeit Einschränkungen in Hinblick auf die Aussagekraft, welche durch den Versuchsaufbau bedingt ist. So stellt sich der klinische Bezug der Ergebnisse vor allem für pathologische Situationen wie Herzinsuffizienz und koronare Herzerkrankung dar. Es muss jedoch ausdrücklich erwähnt werden, dass es sich um normotensive Ratten und kein Herzinsuffizienz-Modell handelte. Die signifikanten Aldosteronspiegel im Serum unter verminderter Salzzufuhr sind als physiologisch zu verstehen [120]. In denkbaren weiterführenden Versuchen wäre eine Untersuchung der Androgen-abhängigen Regulation des MR im Rahmen von chirurgisch- oder medikamentös-induzierten *in vivo*-Modellen zur Herzinsuffizienz von Interesse (beispielsweise Infarkt-Modell, thorakale Ligatur-Modell, Doxorubicin- oder Isoproterenol-Modell).

In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Expressionsstudie in kardialem Gesamtgewebe von nukleären Rezeptoren und deren abhängigen Schlüsselproteinen. Methodisch bedingt kann jedoch keine präzise Aussage über die zugrunde liegende Signaltransduktion gemacht werden. Hierfür wären beispielsweise Zellkultur-Experimente geeignet, die spezifische Regulationen in einzelnen Zellarten des Herzens aufzuschlüsseln. Ebenfalls konnte der durchgeführte Western Blot die Regulation des MR auf Proteinebene durch methodisch bedingte Schwierigkeiten nicht verifizieren. Die dargelegte Androgen-abhängige Regulation des MR basiert dementsprechend rein auf den Ergebnissen der mRNA Messungen. Zusätzlich konnte anhand der Testosteron-Spiegel eine supraphysiologische Stimulation der

Tiere nicht ausgeschlossen werden, auch wenn andere Arbeiten vergleichbare Dosierungen an Testosteron für Wistar-Ratten benutzten.

Des Weiteren geben die vorliegenden Ergebnisse keinen Aufschluss über die funktionellen und histopathologischen Veränderungen im Herzen unter Androgen-Substitution. Echokardiographische Untersuchungen in Hinblick auf eine kardiale Hypertrophie und eine immunhistochemische Evaluation von profibrotischen und inflammatorischen Markern wären von zusätzlichem Erkenntnisgewinn.

In Hinblick auf die klinische Bedeutung der Arbeit müssen die Ergebnisse mit großer Vorsicht interpretiert werden. Erkrankungen wie Herzinsuffizienz oder koronare Herzerkrankung zeigen eine heterogene Ätiologie und involvieren komplexe maladaptive Prozesse. Hierbei sollte eine mögliche Regulation des MR - trotz der Bedeutung der pharmakologischen Blockade - lediglich als Baustein in einer umfassenden Pathophysiologie verstanden werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Kalin, M.F. and B. Zumoff, Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids*, 1990. 55(8): p. 330-52.
2. Tunstall-Pedoe, H., K. Kuulasmaa, M. Mahonen, H. Tolonen, E. Ruokokoski, and P. Amouyel, Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. *Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. Lancet*, 1999. 353(9164): p. 1547-57.
3. Lansky, A.J., V.G. Ng, A. Maehara, G. Weisz, A. Lerman, G.S. Mintz, B. De Bruyne, N. Farhat, G. Niess, I. Jankovic, D. Lazar, K. Xu, M. Fahy, P.W. Serruys, and G.W. Stone, Gender and the extent of coronary atherosclerosis, plaque composition, and clinical outcomes in acute coronary syndromes. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2012. 5(3 Suppl): p. S62-72.
4. Mehilli, J., G. Ndrepepa, A. Kastrati, S.G. Nekolla, C. Markwardt, H. Bollwein, J. Pache, S. Martinoff, J. Dirschinger, M. Schwaiger, and A. Schomig, Gender and myocardial salvage after reperfusion treatment in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 45(6): p. 828-31.
5. Cavaasin, M.A., Z. Tao, S. Menon, and X.P. Yang, Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice. *Life Sci*, 2004. 75(18): p. 2181-92.
6. Martinez-Selles, M., R.N. Doughty, K. Poppe, G.A. Whalley, N. Earle, C. Tribouilloy, J.J. McMurray, K. Swedberg, L. Kober, C. Berry, and I. Squire, Gender and survival in patients with heart failure: interactions with diabetes and aetiology. Results from the MAGGIC individual patient meta-analysis. *Eur J Heart Fail*, 2012. 14(5): p. 473-9.
7. Barrett-Connor, E. and T.L. Bush, Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA*, 1991. 265(14): p. 1861-7.
8. Manson, J.E., M.A. Allison, J.E. Rossouw, J.J. Carr, R.D. Langer, J. Hsia, L.H. Kuller, B.B. Cochrane, J.R. Hunt, S.E. Ludlam, M.B. Pettinger, M. Gass, K.L. Margolis, L. Nathan, J.K. Ockene, R.L. Prentice, J. Robbins, M.L. Stefanick, Whi, and W.-C. Investigators, Estrogen therapy and coronary-artery calcification. *N Engl J Med*, 2007. 356(25): p. 2591-602.
9. Mendelsohn, M.E. and R.H. Karas, The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*, 1999. 340(23): p. 1801-11.
10. Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999. 340(2): p. 115-26.
11. Bruck, B., U. Brehme, N. Gugel, S. Hanke, G. Finking, C. Lutz, N. Benda, F.W. Schmahl, R. Haasis, and H. Hanke, Gender-specific differences in the effects of testosterone and estrogen on the development of atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. 17(10): p. 2192-9.
12. Alexandersen, P., J. Haarbo, I. Byrjalsen, H. Lawaetz, and C. Christiansen, Natural androgens inhibit male atherosclerosis: a study in castrated, cholesterol-fed rabbits. *Circ Res*, 1999. 84(7): p. 813-9.
13. Nathan, L., W. Shi, H. Dinh, T.K. Mukherjee, X. Wang, A.J. Lusis, and G. Chaudhuri, Testosterone inhibits early atherogenesis by conversion to estradiol: critical role of aromatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(6): p. 3589-93.

14. Bourghardt, J., A.S. Wilhelmson, C. Alexanderson, K. De Gendt, G. Verhoeven, A. Krettek, C. Ohlsson, and A. Tivesten, Androgen receptor-dependent and independent atheroprotection by testosterone in male mice. *Endocrinology*, 2010. 151(11): p. 5428-37.
15. Qiu, Y., T. Tanaka, H. Nawata, and T. Yanase, Dihydrotestosterone inhibits lectin-like oxidized-LDL receptor-1 expression in aortic endothelial cells via a NF-kappaB/AP-1-mediated mechanism. *Endocrinology*, 2012. 153(7): p. 3405-15.
16. Mukherjee, T.K., H. Dinh, G. Chaudhuri, and L. Nathan, Testosterone attenuates expression of vascular cell adhesion molecule-1 by conversion to estradiol by aromatase in endothelial cells: implications in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(6): p. 4055-60.
17. Ong, P.J., G. Patrizi, W.C. Chong, C.M. Webb, C.S. Hayward, and P. Collins, Testosterone enhances flow-mediated brachial artery reactivity in men with coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 2000. 85(2): p. 269-72.
18. Webb, C.M., J.G. McNeill, C.S. Hayward, D. de Zeigler, and P. Collins, Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation*, 1999. 100(16): p. 1690-6.
19. Kenny, A.M., K.M. Prestwood, C.A. Gruman, G. Fabregas, B. Biskup, and G. Mansoor, Effects of transdermal testosterone on lipids and vascular reactivity in older men with low bioavailable testosterone levels. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2002. 57(7): p. M460-5.
20. Fujimoto, R., I. Morimoto, E. Morita, H. Sugimoto, Y. Ito, and S. Eto, Androgen receptors, 5 alpha-reductase activity and androgen-dependent proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1994. 50(3-4): p. 169-74.
21. Ng, M.K., C.M. Quinn, J.A. McCrohon, S. Nakhla, W. Jessup, D.J. Handelsman, D.S. Celermajer, and A.K. Death, Androgens up-regulate atherosclerosis-related genes in macrophages from males but not females: molecular insights into gender differences in atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 2003. 42(7): p. 1306-13.
22. Basaria, S., A.D. Coviello, T.G. Travison, T.W. Storer, W.R. Farwell, A.M. Jette, R. Eder, S. Tennstedt, J. Ullor, A. Zhang, K. Choong, K.M. Lakshman, N.A. Mazer, R. Miciek, J. Krasnoff, A. Elmi, P.E. Knapp, B. Brooks, E. Appleman, S. Aggarwal, G. Bhasin, L. Hede-Brierley, A. Bhatia, L. Collins, N. LeBrasseur, L.D. Fiore, and S. Bhasin, Adverse events associated with testosterone administration. *N Engl J Med*, 2010. 363(2): p. 109-22.
23. Cornoldi, A., G. Caminiti, G. Marazzi, C. Vitale, R. Patrizi, M. Volterrani, M. Miceli, M. Fini, G. Spera, and G. Rosano, Effects of chronic testosterone administration on myocardial ischemia, lipid metabolism and insulin resistance in elderly male diabetic patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol*, 2010. 142(1): p. 50-5.
24. Aversa, A., R. Bruzziches, D. Francomano, G. Rosano, A.M. Isidori, A. Lenzi, and G. Spera, Effects of testosterone undecanoate on cardiovascular risk factors and atherosclerosis in middle-aged men with late-onset hypogonadism and metabolic syndrome: results from a 24-month, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Sex Med*, 2010. 7(10): p. 3495-503.
25. Landahl, S., C. Bengtsson, J.A. Sigurdsson, A. Svanborg, and K. Svardsudd, Age-related changes in blood pressure. *Hypertension*, 1986. 8(11): p. 1044-9.
26. Burt, V.L., J.A. Cutler, M. Higgins, M.J. Horan, D. Labarthe, P. Whelton, C. Brown, and E.J. Roccella, Trends in the prevalence, awareness, treatment,

- and control of hypertension in the adult US population. Data from the health examination surveys, 1960 to 1991. *Hypertension*, 1995. 26(1): p. 60-9.
27. Chen, M.J., W.S. Yang, J.H. Yang, C.L. Chen, H.N. Ho, and Y.S. Yang, Relationship between androgen levels and blood pressure in young women with polycystic ovary syndrome. *Hypertension*, 2007. 49(6): p. 1442-7.
 28. Reckelhoff, J.F., H. Zhang, and J.P. Granger, Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1998. 31(1 Pt 2): p. 435-9.
 29. Rowland, N.E. and M.J. Fregly, Role of gonadal hormones in hypertension in the Dahl salt-sensitive rat. *Clin Exp Hypertens A*, 1992. 14(3): p. 367-75.
 30. Yanes, L.L., J.C. Sartori-Valinotti, R. Iliescu, D.G. Romero, L.C. Racusen, H. Zhang, and J.F. Reckelhoff, Testosterone-dependent hypertension and upregulation of intrarenal angiotensinogen in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009. 296(4): p. F771-9.
 31. Reckelhoff, J.F., H. Zhang, K. Srivastava, and J.P. Granger, Gender differences in hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of androgens and androgen receptor. *Hypertension*, 1999. 34(4 Pt 2): p. 920-3.
 32. Martin, D.S., S. Biloft, R. Redetzke, and E. Vogel, Castration reduces blood pressure and autonomic venous tone in male spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 2005. 23(12): p. 2229-36.
 33. Ganten, U., G. Schroder, M. Witt, F. Zimmermann, D. Ganten, and G. Stock, Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effects of anti-androgen treatment. *J Hypertens*, 1989. 7(9): p. 721-6.
 34. Chen, Y.F. and Q.C. Meng, Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. *Life Sci*, 1991. 48(1): p. 85-96.
 35. Golden, K.L., J.D. Marsh, and Y. Jiang, Testosterone regulates mRNA levels of calcium regulatory proteins in cardiac myocytes. *Horm Metab Res*, 2004. 36(4): p. 197-202.
 36. Tsang, S., S.S. Wong, S. Wu, G.M. Kravtsov, and T.M. Wong, Testosterone-augmented contractile responses to alpha1- and beta1-adrenoceptor stimulation are associated with increased activities of RyR, SERCA, and NCX in the heart. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. 296(4): p. C766-82.
 37. Marsh, J.D., M.H. Lehmann, R.H. Ritchie, J.K. Gwathmey, G.E. Green, and R.J. Schiebinger, Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation*, 1998. 98(3): p. 256-61.
 38. Reckelhoff, J.F., H. Zhang, and K. Srivastava, Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system. *Hypertension*, 2000. 35(1 Pt 2): p. 480-3.
 39. Chen, Y.F., A.J. Naftilan, and S. Oparil, Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension*, 1992. 19(5): p. 456-63.
 40. Rands, V.F., D.M. Seth, H. Kobori, and M.C. Prieto, Sexual dimorphism in urinary angiotensinogen excretion during chronic angiotensin II-salt hypertension. *Gen Med*, 2012. 9(4): p. 207-18.
 41. Toot, J., C. Jenkins, G. Dunphy, S. Boehme, M. Hart, A. Milsted, M. Turner, and D. Ely, Testosterone influences renal electrolyte excretion in SHR/y and WKY males. *BMC Physiol*, 2008. 8: p. 5.
 42. Quinkler, M., I.J. Bujalska, K. Kaur, C.U. Onyimba, S. Buhner, B. Allolio, S.V. Hughes, M. Hewison, and P.M. Stewart, Androgen receptor-mediated

- regulation of the alpha-subunit of the epithelial sodium channel in human kidney. *Hypertension*, 2005. 46(4): p. 787-98.
43. Kienitz, T., B. Allolio, C.J. Strasburger, and M. Quinkler, Sex-specific regulation of ENaC and androgen receptor in female rat kidney. *Horm Metab Res*, 2009. 41(5): p. 356-62.
 44. Singh, H., J. Cheng, H. Deng, R. Kemp, T. Ishizuka, A. Nasjletti, and M.L. Schwartzman, Vascular cytochrome P450 4A expression and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis contribute to endothelial dysfunction in androgen-induced hypertension. *Hypertension*, 2007. 50(1): p. 123-9.
 45. Zou, A.P., J.T. Fleming, J.R. Falck, E.R. Jacobs, D. Gebremedhin, D.R. Harder, and R.J. Roman, 20-HETE is an endogenous inhibitor of the large-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel in renal arterioles. *Am J Physiol*, 1996. 270(1 Pt 2): p. R228-37.
 46. de Simone, G., R.B. Devereux, S.R. Daniels, and R.A. Meyer, Gender differences in left ventricular growth. *Hypertension*, 1995. 26(6 Pt 1): p. 979-83.
 47. Scheuer, J., A. Malhotra, T.F. Schaible, and J. Capasso, Effects of gonadectomy and hormonal replacement on rat hearts. *Circ Res*, 1987. 61(1): p. 12-9.
 48. Jankowska, E.A., B. Biel, J. Majda, A. Szklarska, M. Lopuszanska, M. Medras, S.D. Anker, W. Banasiak, P.A. Poole-Wilson, and P. Ponikowski, Anabolic deficiency in men with chronic heart failure: prevalence and detrimental impact on survival. *Circulation*, 2006. 114(17): p. 1829-37.
 49. Guder, G., S. Frantz, J. Bauersachs, B. Allolio, G. Ertl, C.E. Angermann, and S. Stork, Low circulating androgens and mortality risk in heart failure. *Heart*, 2010. 96(7): p. 504-9.
 50. Wu, H.Y., X.F. Wang, J.H. Wang, and J.Y. Li, Testosterone level and mortality in elderly men with systolic chronic heart failure. *Asian J Androl*, 2011. 13(5): p. 759-63.
 51. Anker, S.D., T.P. Chua, P. Ponikowski, D. Harrington, J.W. Swan, W.J. Kox, P.A. Poole-Wilson, and A.J. Coats, Hormonal changes and catabolic/anabolic imbalance in chronic heart failure and their importance for cardiac cachexia. *Circulation*, 1997. 96(2): p. 526-34.
 52. Caminiti, G., M. Volterrani, F. Iellamo, G. Marazzi, R. Massaro, M. Miceli, C. Mammi, M. Piepoli, M. Fini, and G.M. Rosano, Effect of long-acting testosterone treatment on functional exercise capacity, skeletal muscle performance, insulin resistance, and baroreflex sensitivity in elderly patients with chronic heart failure a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *J Am Coll Cardiol*, 2009. 54(10): p. 919-27.
 53. Pugh, P.J., R.D. Jones, J.N. West, T.H. Jones, and K.S. Channer, Testosterone treatment for men with chronic heart failure. *Heart*, 2004. 90(4): p. 446-7.
 54. Stout, M., G.A. Tew, H. Doll, I. Zwierska, N. Woodroffe, K.S. Channer, and J.M. Saxton, Testosterone therapy during exercise rehabilitation in male patients with chronic heart failure who have low testosterone status: a double-blind randomized controlled feasibility study. *Am Heart J*, 2012. 164(6): p. 893-901.
 55. Toma, M., F.A. McAlister, E.E. Coglianese, V. Vidi, S. Vasaiwala, J.A. Bakal, P.W. Armstrong, and J.A. Ezekowitz, Testosterone supplementation in heart failure: a meta-analysis. *Circ Heart Fail*, 2012. 5(3): p. 315-21.

56. Carson, C.C., 3rd and G. Rosano, Exogenous testosterone, cardiovascular events, and cardiovascular risk factors in elderly men: a review of trial data. *J Sex Med*, 2012. 9(1): p. 54-67.
57. Sun, J., L. Fu, X. Tang, Y. Han, D. Ma, J. Cao, N. Kang, and H. Ji, Testosterone modulation of cardiac beta-adrenergic signals in a rat model of heart failure. *Gen Comp Endocrinol*, 2011. 172(3): p. 518-25.
58. Kang, N.N., L. Fu, J. Xu, Y. Han, J.X. Cao, J.F. Sun, and M. Zheng, Testosterone improves cardiac function and alters angiotensin II receptors in isoproterenol-induced heart failure. *Arch Cardiovasc Dis*, 2012. 105(2): p. 68-76.
59. Ikeda, Y., K. Aihara, T. Sato, M. Akaike, M. Yoshizumi, Y. Suzaki, Y. Izawa, M. Fujimura, S. Hashizume, M. Kato, S. Yagi, T. Tamaki, H. Kawano, T. Matsumoto, H. Azuma, and S. Kato, Androgen receptor gene knockout male mice exhibit impaired cardiac growth and exacerbation of angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *J Biol Chem*, 2005. 280(33): p. 29661-6.
60. Russell, D.W. and J.D. Wilson, Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem*, 1994. 63: p. 25-61.
61. Peterson, R.E., J. Imperato-McGinley, T. Gautier, and E. Sturla, Male pseudohermaphroditism due to steroid 5-alpha-reductase deficiency. *Am J Med*, 1977. 62(2): p. 170-91.
62. Ballantyne, T., Q. Du, S. Jovanovic, A. Neemo, R. Holmes, S. Sinha, and A. Jovanovic, Testosterone protects female embryonic heart H9c2 cells against severe metabolic stress by activating estrogen receptors and up-regulating IES SUR2B. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013. 45(2): p. 283-91.
63. Rubio-Gayosso, I., I. Ramirez-Sanchez, I. Ita-Islas, P. Ortiz-Vilchis, G. Gutierrez-Salmean, A. Meaney, I. Palma, I. Olivares, R. Garcia, E. Meaney, and G. Ceballos, Testosterone metabolites mediate its effects on myocardial damage induced by ischemia/reperfusion in male Wistar rats. *Steroids*, 2013. 78(3): p. 362-9.
64. Deslypere, J.P., M. Young, J.D. Wilson, and M.J. McPhaul, Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Mol Cell Endocrinol*, 1992. 88(1-3): p. 15-22.
65. van de Wijngaart, D.J., H.J. Dubbink, M.E. van Royen, J. Trapman, and G. Jenster, Androgen receptor coregulators: recruitment via the coactivator binding groove. *Mol Cell Endocrinol*, 2012. 352(1-2): p. 57-69.
66. Claessens, F., S. Denayer, N. Van Tilborgh, S. Kerkhofs, C. Helsen, and A. Haelens, Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl Recept Signal*, 2008. 6: p. e008.
67. La Spada, A.R., E.M. Wilson, D.B. Lubahn, A.E. Harding, and K.H. Fischbeck, Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, 1991. 352(6330): p. 77-9.
68. Stanford, J.L., J.J. Just, M. Gibbs, K.G. Wicklund, C.L. Neal, B.A. Blumenstein, and E.A. Ostrander, Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Res*, 1997. 57(6): p. 1194-8.
69. Dahlman-Wright, K., A. Wright, J.A. Gustafsson, and J. Carlstedt-Duke, Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J Biol Chem*, 1991. 266(5): p. 3107-12.

70. Cutress, M.L., H.C. Whitaker, I.G. Mills, M. Stewart, and D.E. Neal, Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *J Cell Sci*, 2008. 121(Pt 7): p. 957-68.
71. Matias, P.M., P. Donner, R. Coelho, M. Thomaz, C. Peixoto, S. Macedo, N. Otto, S. Joschko, P. Scholz, A. Wegg, S. Basler, M. Schafer, U. Egner, and M.A. Carrondo, Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenic gene mutations. *J Biol Chem*, 2000. 275(34): p. 26164-71.
72. Sack, J.S., K.F. Kish, C. Wang, R.M. Attar, S.E. Kiefer, Y. An, G.Y. Wu, J.E. Scheffler, M.E. Salvati, S.R. Krystek, Jr., R. Weinmann, and H.M. Einspahr, Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(9): p. 4904-9.
73. Jaaskelainen, J., Molecular biology of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol*, 2012. 352(1-2): p. 4-12.
74. Taplin, M.E., B. Rajeshkumar, S. Halabi, C.P. Werner, B.A. Woda, J. Picus, W. Stadler, D.F. Hayes, P.W. Kantoff, N.J. Vogelzang, and E.J. Small, Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663. *J Clin Oncol*, 2003. 21(14): p. 2673-8.
75. Bevan, C.L., S. Hoare, F. Claessens, D.M. Heery, and M.G. Parker, The AF1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(12): p. 8383-92.
76. Berrevoets, C.A., P. Doesburg, K. Stekete, J. Trapman, and A.O. Brinkmann, Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor with the amino-terminal domain and with the transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor2). *Mol Endocrinol*, 1998. 12(8): p. 1172-83.
77. Voegel, J.J., M.J. Heine, C. Zechel, P. Chambon, and H. Gronemeyer, TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J*, 1996. 15(14): p. 3667-75.
78. Veldscholte, J., C.A. Berrevoets, N.D. Zegers, T.H. van der Kwast, J.A. Grootegoed, and E. Mulder, Hormone-induced dissociation of the androgen receptor-heat-shock protein complex: use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors. *Biochemistry*, 1992. 31(32): p. 7422-30.
79. Hammes, A., T.K. Andreassen, R. Spoelgen, J. Raila, N. Hubner, H. Schulz, J. Metzger, F.J. Schweigert, P.B. Lippa, A. Nykjaer, and T.E. Willnow, Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell*, 2005. 122(5): p. 751-62.
80. Gioeli, D., S.B. Ficarro, J.J. Kwiek, D. Aaronson, M. Hancock, A.D. Catling, F.M. White, R.E. Christian, R.E. Settlage, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, and M.J. Weber, Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem*, 2002. 277(32): p. 29304-14.
81. Marcelli, M., D.L. Stenoien, A.T. Szafran, S. Simeoni, I.U. Agoulnik, N.L. Weigel, T. Moran, I. Mikic, J.H. Price, and M.A. Mancini, Quantifying effects of ligands on androgen receptor nuclear translocation, intranuclear dynamics, and solubility. *J Cell Biochem*, 2006. 98(4): p. 770-88.
82. Curtin, D., S. Jenkins, N. Farmer, A.C. Anderson, D.J. Haisenleder, E. Rissman, E.M. Wilson, and M.A. Shupnik, Androgen suppression of GnRH-stimulated rat LHbeta gene transcription occurs through Sp1 sites in the distal GnRH-responsive promoter region. *Mol Endocrinol*, 2001. 15(11): p. 1906-17.

83. Lanzino, M., D. Sisci, C. Morelli, C. Garofalo, S. Catalano, I. Casaburi, C. Capparelli, C. Giordano, F. Giordano, M. Maggiolini, and S. Ando, Inhibition of cyclin D1 expression by androgen receptor in breast cancer cells--identification of a novel androgen response element. *Nucleic Acids Res*, 2010. 38(16): p. 5351-65.
84. Cato, A.C., D. Henderson, and H. Ponta, The hormone response element of the mouse mammary tumour virus DNA mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region. *EMBO J*, 1987. 6(2): p. 363-8.
85. Ham, J., A. Thomson, M. Needham, P. Webb, and M. Parker, Characterization of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumour virus. *Nucleic Acids Res*, 1988. 16(12): p. 5263-76.
86. Kimura, N., A. Mizokami, T. Oonuma, H. Sasano, and H. Nagura, Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *J Histochem Cytochem*, 1993. 41(5): p. 671-8.
87. Heinlein, C.A. and C. Chang, Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev*, 2002. 23(2): p. 175-200.
88. Spencer, T.E., G. Jenster, M.M. Burcin, C.D. Allis, J. Zhou, C.A. Mizzen, N.J. McKenna, S.A. Onate, S.Y. Tsai, M.J. Tsai, and B.W. O'Malley, Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, 1997. 389(6647): p. 194-8.
89. Ogryzko, V.V., R.L. Schiltz, V. Russanova, B.H. Howard, and Y. Nakatani, The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 1996. 87(5): p. 953-9.
90. Zakharov, M.N., B.K. Pillai, S. Bhasin, J. Ulloor, A.Y. Istomin, C. Guo, A. Godzik, R. Kumar, and R. Jasuja, Dynamics of coregulator-induced conformational perturbations in androgen receptor ligand binding domain. *Mol Cell Endocrinol*, 2011. 341(1-2): p. 1-8.
91. Barbulescu, K., C. Geserick, I. Schuttke, W.D. Schleuning, and B. Haendler, New androgen response elements in the murine pem promoter mediate selective transactivation. *Mol Endocrinol*, 2001. 15(10): p. 1803-16.
92. Kasper, S., P.S. Rennie, N. Bruchofsky, L. Lin, H. Cheng, R. Snoek, K. Dahlman-Wright, J.A. Gustafsson, R.P. Shiu, P.C. Sheppard, and R.J. Matusik, Selective activation of the probasin androgen-responsive region by steroid hormones. *J Mol Endocrinol*, 1999. 22(3): p. 313-25.
93. Verrijdt, G., E. Schoenmakers, P. Alen, A. Haelens, B. Peeters, W. Rombauts, and F. Claessens, Androgen specificity of a response unit upstream of the human secretory component gene is mediated by differential receptor binding to an essential androgen response element. *Mol Endocrinol*, 1999. 13(9): p. 1558-70.
94. Verrijdt, G., A. Haelens, and F. Claessens, Selective DNA recognition by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific regulation of gene expression. *Mol Genet Metab*, 2003. 78(3): p. 175-85.
95. Bastl, C.P. and J.P. Hayslett, The cellular action of aldosterone in target epithelia. *Kidney Int*, 1992. 42(2): p. 250-64.
96. Edwards, C.R., P.M. Stewart, D. Burt, L. Brett, M.A. McIntyre, W.S. Sutanto, E.R. de Kloet, and C. Monder, Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet*, 1988. 2(8618): p. 986-9.

97. Mazancova, K., M. Kopecky, I. Miksik, and J. Pacha, 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the heart of normotensive and hypertensive rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005. 94(1-3): p. 273-7.
98. Qin, W., A.E. Rudolph, B.R. Bond, R. Rocha, E.A. Blomme, J.J. Goellner, J.W. Funder, and E.G. McMahon, Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res*, 2003. 93(1): p. 69-76.
99. Lombes, M., M.E. Oblin, J.M. Gasc, E.E. Baulieu, N. Farman, and J.P. Bonvalet, Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res*, 1992. 71(3): p. 503-10.
100. Funder, J.W., Aldosterone, mineralocorticoid receptors and vascular inflammation. *Mol Cell Endocrinol*, 2004. 217(1-2): p. 263-9.
101. Brilla, C.G. and K.T. Weber, Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med*, 1992. 120(6): p. 893-901.
102. Pimenta, E., R.D. Gordon, A.H. Ahmed, D. Cowley, R. Leano, T.H. Marwick, and M. Stowasser, Cardiac dimensions are largely determined by dietary salt in patients with primary aldosteronism: results of a case-control study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. 96(9): p. 2813-20.
103. Pitt, B., W. Remme, F. Zannad, J. Neaton, F. Martinez, B. Roniker, R. Bittman, S. Hurley, J. Kleiman, M. Gatlin, E. Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure, and I. Survival Study, Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2003. 348(14): p. 1309-21.
104. Pitt, B., F. Zannad, W.J. Remme, R. Cody, A. Castaigne, A. Perez, J. Palensky, and J. Wittes, The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*, 1999. 341(10): p. 709-17.
105. Sun, Y., J. Zhang, L. Lu, S.S. Chen, M.T. Quinn, and K.T. Weber, Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress. *Am J Pathol*, 2002. 161(5): p. 1773-81.
106. Martin-Fernandez, B., N. de las Heras, M. Miana, S. Ballesteros, C. Delgado, S. Song, T. Hintze, V. Cachofeiro, and V. Lahera, Structural, functional, and molecular alterations produced by aldosterone plus salt in rat heart: association with enhanced serum and glucocorticoid-regulated kinase-1 expression. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011. 57(1): p. 114-21.
107. Park, J.B. and E.L. Schiffrin, Cardiac and vascular fibrosis and hypertrophy in aldosterone-infused rats: role of endothelin-1. *Am J Hypertens*, 2002. 15(2 Pt 1): p. 164-9.
108. Chun, T.Y., L.J. Bloem, and J.H. Pratt, Aldosterone inhibits inducible nitric oxide synthase in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology*, 2003. 144(5): p. 1712-7.
109. Zhu, C.J., Q.Q. Wang, J.L. Zhou, H.Z. Liu, F. Hua, H.Z. Yang, and Z.W. Hu, The mineralocorticoid receptor-p38MAPK-NFkappaB or ERK-Sp1 signal pathways mediate aldosterone-stimulated inflammatory and profibrotic responses in rat vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2012. 33(7): p. 873-8.
110. Das, S., T. Aiba, M. Rosenberg, K. Hessler, C. Xiao, P.A. Quintero, F.G. Ottaviano, A.C. Knight, E.L. Graham, P. Bostrom, M.R. Morissette, F. del Monte, M.J. Begley, L.C. Cantley, P.T. Ellinor, G.F. Tomaselli, and A. Rosenzweig, Pathological role of serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 in adverse ventricular remodeling. *Circulation*, 2012. 126(18): p. 2208-19.

111. Voelkl, J., Y. Lin, I. Alesutan, M.S. Ahmed, V. Pasham, S. Mia, S. Gu, M. Feger, A. Saxena, B. Metzler, D. Kuhl, B.J. Pichler, and F. Lang, Sgk1 sensitivity of Na(+)/H(+) exchanger activity and cardiac remodeling following pressure overload. *Basic Res Cardiol*, 2012. 107(2): p. 236.
112. Martin-Fernandez, B., N. de las Heras, M. Miana, S. Ballesteros, M. Valero-Munoz, D. Vassallo, A.P. Davel, L.V. Rossoni, V. Cachofeiro, and V. Lahera, Spironolactone prevents alterations associated with cardiac hypertrophy produced by isoproterenol in rats: involvement of serum- and glucocorticoid-regulated kinase type 1. *Exp Physiol*, 2012. 97(6): p. 710-8.
113. Vallon, V., A.W. Wyatt, K. Klingel, D.Y. Huang, A. Hussain, S. Berchtold, B. Friedrich, F. Grahmmer, R.S. Belaiba, A. Gorchach, P. Wulff, J. Daut, N.D. Dalton, J. Ross, Jr., U. Flogel, J. Schrader, H. Osswald, R. Kandolf, D. Kuhl, and F. Lang, SGK1-dependent cardiac CTGF formation and fibrosis following DOCA treatment. *J Mol Med (Berl)*, 2006. 84(5): p. 396-404.
114. Savory, J.G., G.G. Prefontaine, C. Lamprecht, M. Liao, R.F. Walther, Y.A. Lefebvre, and R.J. Hache, Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(3): p. 781-93.
115. Nishi, M., M. Tanaka, K. Matsuda, M. Sunaguchi, and M. Kawata, Visualization of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor interactions in living cells with GFP-based fluorescence resonance energy transfer. *J Neurosci*, 2004. 24(21): p. 4918-27.
116. Rickard, A.J., J.W. Funder, P.J. Fuller, and M.J. Young, The role of the glucocorticoid receptor in mineralocorticoid/salt-mediated cardiac fibrosis. *Endocrinology*, 2006. 147(12): p. 5901-6.
117. Rickard, A.J., J.W. Funder, J. Morgan, P.J. Fuller, and M.J. Young, Does glucocorticoid receptor blockade exacerbate tissue damage after mineralocorticoid/salt administration? *Endocrinology*, 2007. 148(10): p. 4829-35.
118. Oakley, R.H., R. Ren, D. Cruz-Topete, G.S. Bird, P.H. Myers, M.C. Boyle, M.D. Schneider, M.S. Willis, and J.A. Cidlowski, Essential role of stress hormone signaling in cardiomyocytes for the prevention of heart disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(42): p. 17035-40.
119. De, P., S.G. Roy, D. Kar, and A. Bandyopadhyay, Excess of glucocorticoid induces myocardial remodeling and alteration of calcium signaling in cardiomyocytes. *J Endocrinol*, 2011. 209(1): p. 105-14.
120. Hofmann, P.J., M. Michaelis, F. Gotz, C. Bartel, T. Kienitz, and M. Quinkler, Flutamide increases aldosterone levels in gonadectomized male but not female Wistar rats. *Am J Hypertens*, 2012. 25(6): p. 697-703.
121. Michaelis, M., P.J. Hofmann, F. Gotz, C. Bartel, T. Kienitz, and M. Quinkler, Sex-specific effects of spironolactone on blood pressure in gonadectomized male and female Wistar rats. *Horm Metab Res*, 2012. 44(4): p. 291-5.
122. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 2002. 30(9): p. e36.
123. Fejes-Toth, G. and A. Naray-Fejes-Toth, Early aldosterone-regulated genes in cardiomyocytes: clues to cardiac remodeling? *Endocrinology*, 2007. 148(4): p. 1502-10.

124. Gomez-Sanchez, C.E., M. Warden, M.T. Gomez-Sanchez, X. Hou, and E.P. Gomez-Sanchez, Diverse immunostaining patterns of mineralocorticoid receptor monoclonal antibodies. *Steroids*, 2011. 76(14): p. 1541-5.
125. Punjabi, U., J.P. Deslypere, L. Verdonck, and A. Vermeulen, Androgen and precursor levels in serum and testes of adult rats under basal conditions and after hCG stimulation. *J Steroid Biochem*, 1983. 19(4): p. 1481-90.
126. Heywood, L.H., Testosterone levels in the male laboratory rat: variation under experimental conditions. *Int J Androl*, 1980. 3(5): p. 519-29.
127. Ljubojevic, M., D. Balen, D. Breljak, M. Kusan, N. Anzai, A. Bahn, G. Burckhardt, and I. Sabolic, Renal expression of organic anion transporter OAT2 in rats and mice is regulated by sex hormones. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. 292(1): p. F361-72.
128. Ali, B.H. and I.H. Ahmed, Hormonal replacement therapy in an animal model with chronic renal failure and gonadectomy: biochemical and hematological study. *Ren Fail*, 2006. 28(4): p. 331-5.
129. Zhou, P., L. Fu, Z. Pan, D. Ma, Y. Zhang, F. Qu, L. Guo, J. Cao, Q. Gao, and Y. Han, Testosterone deprivation by castration impairs expression of voltage-dependent potassium channels in rat aorta. *Eur J Pharmacol*, 2008. 593(1-3): p. 87-91.
130. Thumelin, S., C. Kohl, J. Girard, and J.P. Pegorier, Atypical expression of mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase in subcutaneous adipose tissue of male rats. *J Lipid Res*, 1999. 40(6): p. 1071-7.
131. de Lignieres, B., Transdermal dihydrotestosterone treatment of 'andropause'. *Ann Med*, 1993. 25(3): p. 235-41.
132. Wright, A.S., R.C. Douglas, L.N. Thomas, C.B. Lazier, and R.S. Rittmaster, Androgen-induced regrowth in the castrated rat ventral prostate: role of 5alpha-reductase. *Endocrinology*, 1999. 140(10): p. 4509-15.
133. Pimenta, E., K.K. Gaddam, M.N. Pratt-Ubunama, M.K. Nishizaka, I. Aban, S. Oparil, and D.A. Calhoun, Relation of dietary salt and aldosterone to urinary protein excretion in subjects with resistant hypertension. *Hypertension*, 2008. 51(2): p. 339-44.
134. Cogswell, M.E., Z. Zhang, A.L. Carriquiry, J.P. Gunn, E.V. Kuklina, S.H. Saydah, Q. Yang, and A.J. Moshfegh, Sodium and potassium intakes among US adults: NHANES 2003-2008. *Am J Clin Nutr*, 2012. 96(3): p. 647-57.
135. Sacks, F.M., L.P. Svetkey, W.M. Vollmer, L.J. Appel, G.A. Bray, D. Harsha, E. Obarzanek, P.R. Conlin, E.R. Miller, 3rd, D.G. Simons-Morton, N. Karanja, P.H. Lin, and D.A.-S.C.R. Group, Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. *N Engl J Med*, 2001. 344(1): p. 3-10.
136. Rakova, N., K. Juttner, A. Dahlmann, A. Schroder, P. Linz, C. Kopp, M. Rauh, U. Goller, L. Beck, A. Agureev, G. Vassilieva, L. Lenkova, B. Johannes, P. Wabel, U. Moissl, J. Vienken, R. Gerzer, K.U. Eckardt, D.N. Muller, K. Kirsch, B. Morukov, F.C. Luft, and J. Titze, Long-term space flight simulation reveals infradian rhythmicity in human Na(+) balance. *Cell Metab*, 2013. 17(1): p. 125-31.
137. Ricchiuti, V., N. Lapointe, L. Pojoga, T. Yao, L. Tran, G.H. Williams, and G.K. Adler, Dietary sodium intake regulates angiotensin II type 1, mineralocorticoid receptor, and associated signaling proteins in heart. *J Endocrinol*, 2011. 211(1): p. 47-54.

138. Escoubet, B., C. Coureau, M. Blot-Chabaud, J.P. Bonvalet, and N. Farman, Corticosteroid receptor mRNA expression is unaffected by corticosteroids in rat kidney, heart, and colon. *Am J Physiol*, 1996. 270(5 Pt 1): p. C1343-53.
139. Meyer, A.S. and T.J. Schmidt, In contrast to glucocorticoid receptors, mineralocorticoid receptors are not autoregulated in rat distal colon epithelia. *Endocrinology*, 1994. 134(3): p. 1163-72.
140. Takeda, H., T. Nakamoto, J. Kokontis, G.W. Chodak, and C. Chang, Autoregulation of androgen receptor expression in rodent prostate: immunohistochemical and in situ hybridization analysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. 177(1): p. 488-96.
141. Kerr, J.E., R.J. Allore, S.G. Beck, and R.J. Handa, Distribution and hormonal regulation of androgen receptor (AR) and AR messenger ribonucleic acid in the rat hippocampus. *Endocrinology*, 1995. 136(8): p. 3213-21.
142. Prins, G.S. and L. Birch, Immunocytochemical analysis of androgen receptor along the ducts of the separate rat prostate lobes after androgen withdrawal and replacement. *Endocrinology*, 1993. 132(1): p. 169-78.
143. Gad, Y.Z., G.D. Berkovitz, C.J. Migeon, and T.R. Brown, Studies of up-regulation of androgen receptors in genital skin fibroblasts. *Mol Cell Endocrinol*, 1988. 57(3): p. 205-13.
144. Wiren, K.M., X. Zhang, C. Chang, E. Keenan, and E.S. Orwoll, Transcriptional up-regulation of the human androgen receptor by androgen in bone cells. *Endocrinology*, 1997. 138(6): p. 2291-300.
145. Quarumby, V.E., W.G. Yarbrough, D.B. Lubahn, F.S. French, and E.M. Wilson, Autologous down-regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol*, 1990. 4(1): p. 22-8.
146. Wolf, D.A., T. Herzinger, H. Hermeking, D. Blaschke, and W. Horz, Transcriptional and posttranscriptional regulation of human androgen receptor expression by androgen. *Mol Endocrinol*, 1993. 7(7): p. 924-36.
147. Takeda, M., T. Tatsumi, S. Matsunaga, H. Hayashi, M. Kimata, S. Honsho, S. Nishikawa, A. Mano, J. Shiraishi, H. Yamada, T. Takahashi, S. Matoba, M. Kobara, and H. Matsubara, Spironolactone modulates expressions of cardiac mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 and prevents ventricular remodeling in post-infarct rat hearts. *Hypertens Res*, 2007. 30(5): p. 427-37.
148. Steelman, S.L., J.R. Brooks, E.R. Morgan, and D.J. Patanelli, Anti-androgenic activity of spironolactone. *Steroids*, 1969. 14(4): p. 449-50.
149. de Gasparo, M., U. Joss, H.P. Ramjoue, S.E. Whitebread, H. Haenni, L. Schenkel, C. Kraehenbuehl, M. Biollaz, J. Grob, J. Schmidlin, and et al., Three new epoxy-spirolactone derivatives: characterization in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, 1987. 240(2): p. 650-6.
150. Sanchez-Mas, J., M.C. Turpin, A. Lax, J.A. Ruiperez, M. Valdes Chavarri, and D.A. Pascual-Figal, Differential actions of eplerenone and spironolactone on the protective effect of testosterone against cardiomyocyte apoptosis in vitro. *Rev Esp Cardiol*, 2010. 63(7): p. 779-87.
151. Milik, E., E. Szczepanska-Sadowska, W. Maslinski, and A. Cudnoch-Jedrzejewska, Enhanced expression of mineralocorticoid receptors in the heart after the myocardial infarct in rats. *J Physiol Pharmacol*, 2007. 58(4): p. 745-55.
152. Ohtani, T., M. Ohta, K. Yamamoto, T. Mano, Y. Sakata, M. Nishio, Y. Takeda, J. Yoshida, T. Miwa, M. Okamoto, T. Masuyama, Y. Nonaka, and M. Hori, Elevated cardiac tissue level of aldosterone and mineralocorticoid receptor in

- diastolic heart failure: Beneficial effects of mineralocorticoid receptor blocker. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007. 292(2): p. R946-54.
153. Yoshida, M., J. Ma, T. Tomita, N. Morikawa, N. Tanaka, K. Masamura, Y. Kawai, and I. Miyamori, Mineralocorticoid receptor is overexpressed in cardiomyocytes of patients with congestive heart failure. *Congest Heart Fail*, 2005. 11(1): p. 12-6.
154. Lothar, A., S. Berger, R. Gilsbach, S. Rosner, A. Ecke, F. Barreto, J. Bauersachs, G. Schutz, and L. Hein, Ablation of mineralocorticoid receptors in myocytes but not in fibroblasts preserves cardiac function. *Hypertension*, 2011. 57(4): p. 746-54.
155. Rickard, A.J., J. Morgan, G. Tesch, J.W. Funder, P.J. Fuller, and M.J. Young, Deletion of mineralocorticoid receptors from macrophages protects against deoxycorticosterone/salt-induced cardiac fibrosis and increased blood pressure. *Hypertension*, 2009. 54(3): p. 537-43.
156. Beggah, A.T., B. Escoubet, S. Puttini, S. Cailmail, V. Delage, A. Ouvrard-Pascaud, B. Bocchi, M. Peuchmaur, C. Delcayre, N. Farman, and F. Jaisser, Reversible cardiac fibrosis and heart failure induced by conditional expression of an antisense mRNA of the mineralocorticoid receptor in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(10): p. 7160-5.
157. Kanashiro-Takeuchi, R.M., B. Heidecker, G. Lamirault, J.W. Dharamsi, and J.M. Hare, Sex-specific impact of aldosterone receptor antagonism on ventricular remodeling and gene expression after myocardial infarction. *Clin Transl Sci*, 2009. 2(2): p. 134-42.
158. Arias-Loza, P.A., K. Hu, C. Dienesch, A.M. Mehlich, S. Konig, V. Jazbutyte, L. Neyses, C. Hegele-Hartung, K. Heinrich Fritzeimer, and T. Pelzer, Both estrogen receptor subtypes, alpha and beta, attenuate cardiovascular remodeling in aldosterone salt-treated rats. *Hypertension*, 2007. 50(2): p. 432-8.
159. Chen, S.Y., A. Bhargava, L. Mastroberardino, O.C. Meijer, J. Wang, P. Buse, G.L. Firestone, F. Verrey, and D. Pearce, Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(5): p. 2514-9.
160. Shanmugam, I., G. Cheng, P.F. Terranova, J.B. Thrasher, C.P. Thomas, and B. Li, Serum/glucocorticoid-induced protein kinase-1 facilitates androgen receptor-dependent cell survival. *Cell Death Differ*, 2007. 14(12): p. 2085-94.
161. Kyprianou, N. and J.T. Isaacs, Expression of transforming growth factor-beta in the rat ventral prostate during castration-induced programmed cell death. *Mol Endocrinol*, 1989. 3(10): p. 1515-22.
162. Qi, W., S. Gao, and Z. Wang, Transcriptional regulation of the TGF-beta1 promoter by androgen receptor. *Biochem J*, 2008. 416(3): p. 453-62.
163. Qi, W., S. Gao, J. Chu, L. Zhou, and Z. Wang, Negative androgen-response elements mediate androgen-dependent transcriptional inhibition of TGF-beta1 and CDK2 promoters in the prostate gland. *J Androl*, 2012. 33(1): p. 27-36.
164. Zatelli, M.C., R. Rossi, and E.C. degli Uberti, Androgen influences transforming growth factor-beta1 gene expression in human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. 85(2): p. 847-52.
165. Montalvo, C., A.V. Villar, D. Merino, R. Garcia, M. Ares, M. Llano, M. Cobo, M.A. Hurle, and J.F. Nistal, Androgens contribute to sex differences in myocardial remodeling under pressure overload by a mechanism involving TGF-beta. *PLoS One*, 2012. 7(4): p. e35635.

166. Yu, H.C., L.M. Burrell, M.J. Black, L.L. Wu, R.J. Dilley, M.E. Cooper, and C.I. Johnston, Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation*, 1998. 98(23): p. 2621-8.
167. Ren, R., R.H. Oakley, D. Cruz-Topete, and J.A. Cidlowski, Dual role for glucocorticoids in cardiomyocyte hypertrophy and apoptosis. *Endocrinology*, 2012. 153(11): p. 5346-60.
168. Tsutsui, H., T. Ide, S. Hayashidani, S. Kinugawa, N. Suematsu, H. Utsumi, and A. Takeshita, Effects of ACE inhibition on left ventricular failure and oxidative stress in Dahl salt-sensitive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2001. 37(6): p. 725-33.
169. Satoh, M., C.M. Matter, H. Ogita, K. Takeshita, C.Y. Wang, G.W. Dorn, 2nd, and J.K. Liao, Inhibition of apoptosis-regulated signaling kinase-1 and prevention of congestive heart failure by estrogen. *Circulation*, 2007. 115(25): p. 3197-204.
170. Swezey, N.B., F. Ghibu, S. Gagnon, E. Schotman, and Q. Hamid, Glucocorticoid receptor mRNA and protein in fetal rat lung in vivo: modulation by glucocorticoid and androgen. *Am J Physiol*, 1998. 275(1 Pt 1): p. L103-9.
171. Kerr, J.E., S.G. Beck, and R.J. Handa, Androgens modulate glucocorticoid receptor mRNA, but not mineralocorticoid receptor mRNA levels, in the rat hippocampus. *J Neuroendocrinol*, 1996. 8(6): p. 439-47.
172. Zhang, L., R. Cui, X. Cheng, and J. Du, Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating I κ B kinase. *Cancer Res*, 2005. 65(2): p. 457-64.
173. Waldegger, S., K. Klingel, P. Barth, M. Sauter, M.L. Rfer, R. Kandolf, and F. Lang, h-sgk serine-threonine protein kinase gene as transcriptional target of transforming growth factor beta in human intestine. *Gastroenterology*, 1999. 116(5): p. 1081-8.
174. Takachi, R., M. Inoue, T. Shimazu, S. Sasazuki, J. Ishihara, N. Sawada, T. Yamaji, M. Iwasaki, H. Iso, Y. Tsubono, S. Tsugane, and G. Japan Public Health Center-based Prospective Study, Consumption of sodium and salted foods in relation to cancer and cardiovascular disease: the Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Am J Clin Nutr*, 2010. 91(2): p. 456-64.
175. O'Donnell, M.J., S. Yusuf, A. Mente, P. Gao, J.F. Mann, K. Teo, M. McQueen, P. Sleight, A.M. Sharma, A. Dans, J. Probstfield, and R.E. Schmieder, Urinary sodium and potassium excretion and risk of cardiovascular events. *JAMA*, 2011. 306(20): p. 2229-38.
176. Chen, J., D. Gu, J. Huang, D.C. Rao, C.E. Jaquish, J.E. Hixson, C.S. Chen, J. Chen, F. Lu, D. Hu, T. Rice, T.N. Kelly, L.L. Hamm, P.K. Whelton, J. He, and G. GenSalt Collaborative Research, Metabolic syndrome and salt sensitivity of blood pressure in non-diabetic people in China: a dietary intervention study. *Lancet*, 2009. 373(9666): p. 829-35.
177. Alderman, M.H., S. Madhavan, H. Cohen, J.E. Sealey, and J.H. Laragh, Low urinary sodium is associated with greater risk of myocardial infarction among treated hypertensive men. *Hypertension*, 1995. 25(6): p. 1144-52.
178. Stolarz-Skrzypek, K., T. Kuznetsova, L. Thijs, V. Tikhonoff, J. Seidlerova, T. Richart, Y. Jin, A. Olszanecka, S. Malyutina, E. Casiglia, J. Filipovsky, K. Kawecka-Jaszcz, Y. Nikitin, J.A. Staessen, and I. European Project on Genes in Hypertension, Fatal and nonfatal outcomes, incidence of hypertension, and blood pressure changes in relation to urinary sodium excretion. *JAMA*, 2011. 305(17): p. 1777-85.

179. Alderman, M.H. and H.W. Cohen, Dietary sodium intake and cardiovascular mortality: controversy resolved? *Am J Hypertens*, 2012. 25(7): p. 727-34.
180. Taylor, R.S., K.E. Ashton, T. Moxham, L. Hooper, and S. Ebrahim, Reduced dietary salt for the prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 2011(7): p. CD009217.
181. Paterna, S., P. Gaspare, S. Fasullo, F.M. Sarullo, and P. Di Pasquale, Normal-sodium diet compared with low-sodium diet in compensated congestive heart failure: is sodium an old enemy or a new friend? *Clin Sci (Lond)*, 2008. 114(3): p. 221-30.
182. Achar, S., A. Rostamian, and S.M. Narayan, Cardiac and metabolic effects of anabolic-androgenic steroid abuse on lipids, blood pressure, left ventricular dimensions, and rhythm. *Am J Cardiol*, 2010. 106(6): p. 893-901.

7. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Christopher Bartel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Androgen-abhängige Regulation von Steroidhormonrezeptoren im Herz von Wistar-Ratten in Abhängigkeit von der Salzaufnahme“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

8. Lebenslauf

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

9. Anteilsklärung an Publikationen

Christopher Bartel hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1 (Kongressbeitrag): Bartel C, Hofmann PJ, Michaelis M, Götz F, Quinkler M, Kienitz T. Mineralo- and glucocorticoid receptor expressions in the male rat heart depend on salt status and androgen levels. 54. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE).

Beitrag im Einzelnen:

Erhebung der Daten, Auswertung und Interpretation der Ergebnisse, eigenständige Gestaltung und Präsentation des Vortrages

Publikation 2: Hofmann PJ, Michaelis M, Götz F, **Bartel C**, Kienitz T, Quinkler M. Flutamide increases aldosterone levels in gonadectomized male but not female Wistar rats. Am J Hypertens. 2012 Jun;25(6):697-703.

Beitrag im Einzelnen:

Thematische Ergänzungen und Korrekturen des Manuskripts

Publikation 3: Michaelis M, Hofmann PJ, Götz F, **Bartel C**, Kienitz T, Quinkler M. Sex-specific effects of spironolactone on blood pressure in gonadectomized male and female Wistar rats. Horm Metab Res. 2012 Apr;44(4):291-5.

Beitrag im Einzelnen:

Thematische Ergänzungen und Korrekturen des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Datum

Unterschrift

10. Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Marcus Quinkler für die Überlassung des Themas und insbesondere für seine fachliche Beratung und wissenschaftliche Förderung. Auch Frau Dr. med. Kienitz möchte in Besonderem danken für Ihre außerordentlich engagierte und motivierende Betreuung meiner Dissertation.

Zudem danke ich den Mitarbeitern des Institutes für experimentelle Endokrinologie und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Köhrle für die Unterstützung bei der Durchführung des Projektes. Dank gilt auch den Mitarbeitern des Labors für klinische Endokrinologie und insbesondere Dr. Peter Hofmann und Dr. Marten Michaelis für die Durchführung der Tierversuche und weiterhin Sabine Wricke, welche die Arbeit im Labor sehr bereichert hat.

Ich danke der Klinik für Dermatologie der Charité Universitätsmedizin Berlin für die freundliche Genehmigung zur Mitbenutzung ihrer Geräte, sowie Herrn Prof. Dr. Celso Gomez-Sanchez, University of Mississippi (USA) für die Bereitstellung des Antikörpers gegen den Mineralokortikoidrezeptor.

Von Herzen danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich in der langen Zeit begleitet haben. Meine Großmutter und Schwester hatten immer ein offenes Ohr für mich und gaben mir Motivation zur Vollendung dieser Arbeit. Meine gute Freundin Nina konnte die Höhen und Tiefen im Laufe der Jahre miterleben und war mir ein großer Halt.