

Untersuchungen zur Pathogenese von primärem Hyperaldosteronismus in neugeborenen Task3^{-/-} Mäusen und adrenokortikalen Zellen mit KCNJ5- Mutation

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
– BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Philipp Tauber aus Straubing
im Jahr 2013

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Dezember 2010 bis Dezember 2013 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Richard Warth am Lehrstuhl für Medizinische Zellbiologie/Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am: 25.11.2013

Die Arbeit wurde angeleitet von: Herr Prof. Dr. med. Richard Warth

Prüfungsausschuss:	Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner	(Vorsitzender)
	Herr Prof. Dr. Richard Warth	(1. Gutachter/Prüfer)
	Herr Prof. Dr. Stephan Schneuwly	(2. Gutachter/Prüfer)
	Herr Prof. Dr. Jens Schlossmann	(3. Prüfer)

Unterschrift

(Philipp Tauber)

Meinem Großvater

Emil Tauber

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Die Nebenniere	1
1.1.1 Aufbau und Funktion der Nebenniere	1
1.1.2 Entwicklung der Nebenniere.....	2
1.2. Systemische Regulation und Wirkung von Aldosteron	3
1.2.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	3
1.2.2 Wirkungen von Aldosteron	5
1.2.3 Syntheseweg von Aldosteron.....	7
1.3 Pathophysiologie: Aldosteronbedingte Krankheitsbilder	9
1.3.1 Ursachen und Folgen von Hyperaldosteronismus	9
1.3.2 Hypoaldosteronismus	10
1.4 Zelluläre Regulation der Aldosteronsekretion	10
1.4.1 Regulation durch Angiotensin II	10
1.4.2 Regulation durch extrazelluläres Kalium.....	12
1.4.3 Calcium-induzierte CYP11B2-Transkription	13
1.5 Kaliumkanäle in der Nebenniere	14
1.6 Hyperaldosteronismus durch Störungen der zellulären Regulation	15
1.6.1 Hyperaldosteronismus durch Deletion von Task-Kanälen in Mäusen	15
1.6.2 KCNJ5-Mutationen als Ursache für Hyperaldosteronismus beim Menschen	17
1.7 Zielsetzung.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Methoden zur Charakterisierung neugeborener Task3 ^{-/-} Mäuse	21
2.1.1 Task3 ^{-/-} Mausmodell	21
2.1.2 Bestimmung der Plasma-Na ⁺ -Konzentration und des Hämatokrits.....	21
2.1.3 Steroidhormonmessungen.....	21
2.1.4 Nebennierenlysate zur Aldosteronbestimmung	22
2.1.5 Immunfluoreszenzfärbung	22

2.1.6 Reninmessung in Plasmaproben und Gewebelysaten	23
2.1.7 RNA-Isolation und quantitative Real-time PCR	23
2.1.8 Genechip-Analyse des adrenalen RNA-Expressionsprofils	24
2.1.9 Statistik	25
2.2 Methoden zur Charakterisierung von KCNJ5-Mutationen	26
2.2.1 Zellkultur und Transfektion	26
2.2.2 Patch clamp Experimente	27
2.2.3 Ca^{2+} -Messung an transfizierten NCI-Zellen	27
2.2.4 RNA-Isolation und quantitative Real-time PCR	28
2.2.5 Substanzen zur pharmakologischen Charakterisierung von KCNJ5 L168R	28
2.2.6 Statistik	28
3. Ergebnisse	29
3.1 Adrenaler Phänotyp der neonatalen Task3 ^{-/-} Maus	29
3.1.1 Lokalisation von Task3 und Cyp11b2 in Nebennieren neugeborener Mäuse	29
3.1.2 Adrenales Steroidhormonprofil neugeborener Task3 ^{-/-} Mäuse	30
3.1.3 Adrenale mRNA-Expression steroidogener Enzyme in Task3 ^{-/-} Mäusen	31
3.1.4 Plasma- Na^+ -Level und Hämatokrit in neugeborenen Task3 ^{-/-} Mäusen	32
3.1.5 Microarray-Analyse: Adrenales Expressionsprofil 1 und 12 Tage alter Mäuse	33
3.1.6 Reninexpression in Nebennieren neugeborener Task3 ^{-/-} Mäuse	35
3.1.7 Reninkonzentration in Plasma und Nierenlysaten von Task3 ^{-/-} Mäusen	37
3.1.8 Adrenaler Phänotyp der Task3 ^{-/-} Maus während der fötalen Entwicklung	38
3.1.9 Weitere Phänotyp-assoziierte, regulierte Gene in Task3 ^{-/-} Mäusen	39
3.2 Funktionelle und pharmakologische Untersuchung APA-assoziiierter KCNJ5-Mutationen ...	40
3.2.1 Verlust der Ionenselektivität durch Mutationen in KCNJ5	41
3.2.2 Gesteigerte Ca^{2+} -Aktivität in NCI-Zellen mit KCNJ5-Mutation	44
3.2.3 Expression von NCX und NCKX in humanem Nebennierengewebe	47
3.2.4 Pharmakologische Eigenschaften von KCNJ5 L168R	48

4. Diskussion	52
4.1 Hyperaldosteronismus in neonatalen Task3 ^{-/-} Mäusen	52
4.1.1 Störung der adrenalen Steroidhormonproduktion in neugeborenen Task3 ^{-/-} Mäusen..	52
4.1.2 Adrenale Entwicklungsstörungen ursächlich für Hyperaldosteronismus in neonatalen Task3 ^{-/-} Mäusen?	54
4.1.3 Adrenale Reninexpression in neugeborenen Task3 ^{-/-} Mäusen	54
4.2 Pathophysiologie und Pharmakologie von APA-assoziierten KCNJ5-Mutanten	57
4.2.1 Pathologischer Na ⁺ -Einstrom und Depolarisation in KCNJ5-mutierten Zellen.....	57
4.2.2 Erhöhte Ca ²⁺ -Aktivität in NCI-Zellen mit KCNJ5-Mutation	59
4.2.3 Pharmakologie des mutierten KCNJ5-Kanals (L168R)	60
4.3 Bedeutung von Kaliumkanälen für die Pathophysiologie von primärem Hyperaldosteronismus	62
5. Zusammenfassung.....	64
6. Literaturverzeichnis	66
7. Anhang	79
7.1 Arbeitsbezogene Daten	79
7.1.1 Primersequenzen für Real-time PCR	79
7.1.2 Adrenales mRNA-Expressionsprofil von Wildtyp und Task3 ^{-/-} Mäusen	79
7.1.3 Plasmidkarte pIRES-CD8	83
7.1.4 Inhibitoren des KCNJ5 L168R-Kanals.....	84
7.2 Personenbezogene Daten	85
7.2.1 Veröffentlichte Publikationen	85
7.2.2 Publikationen in Revision	86
7.2.3 Kongressbeiträge.....	86
7.2.4 Eidesstattliche Erklärung	87
8. Danksagung	88

Abkürzungsverzeichnis:

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
11-DOC	11-Desoxycorticosteron
ACE	Angiotensin I-Converting-Enzyme
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
APA	Aldosteronproduzierendes Adenom
ARR	Aldosteron-Renin-Ratio
ASD	Aldosterone Synthase Deficiency
AT1	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
ATF	Activating transcription factor
BSA	Bovines Serum Albumin
CamK	Calcium/Calmodulin-abhängige Protein Kinase
CMO	Corticosterone Methyloxidase Deficiency
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element Bindeprotein
CYP	Cytochrom-P450-Enzyme
CYP11B1	11β-Hydroxylase
CYP11B2	Aldosteronsynthase
CYP17	17-alpha-Hydroxyprogesteron Aldolase
d	Tag
Dab2	Disabled Homolog 2
DAG	Diacylglycerin
E	Tag nach Befruchtung (Embryonaltag)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum
FH	Familiärer Hyperaldosteronismus
G _i	Inhibitorisches G-Protein
G _q	Phospholipase C gekoppeltes G-Protein

HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
IHA	Idiopathischer Hyperaldosteronismus
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
J3	KCNJ3
J5	KCNJ5
K _{2P} - Kanäle	Zwei-Porendomänen Kaliumkanäle
KCNE1	Potassium voltage-gated channel subfamily E member 1
KCNJ3	Potassium inwardly-rectifying channel subfamily J member 3
KCNJ5	Potassium inwardly-rectifying channel subfamily J member 5
KCNM	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M
KCNQ1	Potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1
LDL	Low-density-Lipoproteine
LREH	Low-renin essential hypertension
M2 Rezeptor	Muskarinischer Acetylcholinrezeptor Typ2
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
Maxi K	Potassium large conductance calcium-activated channel
mM	millimolar (mmol/l)
MR	Mineralokortikoid-Rezeptor
mut	mutiert
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
n	Anzahl
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NBRE	nerve growth factor-responsive element (auch NR4A1)
NCKX	Na ⁺ /Ca ²⁺ /K ⁺ -Austauscher
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
ng	Nanogramm
NGFIB	Nerve growth factor IB
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
nm	Nanometer
NMDG	N-Methyl-D-glucaminchlorid
NNM	Nebennierenmark
NNR	Nebennierenrinde
NURR1	Nuclear receptor related 1 protein (auch NR4A2)
PA	Primärer Hyperaldosteronismus

PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEN	Penicillin
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase
PRC	Plasmareninkonzentration
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAS	Renin-Angiotensin-System
ROMK	Renal outer medullary potassium (K) channel (KCNJ1)
rpm	round per minute
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Real-time PCR
SDS	Dodecylsulfat Natriumsalz
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SGK1	Serum and glucocorticoid inducible kinase isoform 1
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
STREP	Streptomycin
TASK	TWIK-related acid sensitive K^+ channel
Task1 ^{-/-}	Task1 knockout Maus
Task1 ^{-/-} / Task3 ^{-/-}	Task1 und Task3 doppelknockout Maus
Task3 ^{-/-}	Task3 knockout Maus
TREK	TWIK-related K^+ channel
TWIK	Tandem of P domains in a weak inward rectifying K^+ channel
ÜN	über Nacht
V	Volt
WT	Wildtyp
Zf	Zona fasciculata
Zg	Zona glomerulosa
ZNS	zentrales Nervensystem
Zr	Zona reticularis

1. Einleitung

Arterieller Bluthochdruck entwickelt sich immer mehr zur Volkskrankheit, wobei bereits 10-40 % der industrialisierten Gesellschaft ein erhöhtes Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen aufweisen [1, 2]. Die Ursache von Bluthochdruck liegt häufig in einer Störung oder chronischen Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Klinische Studien konnten zeigen, dass ein dauerhafter Anstieg des Plasmaaldosteronlevels (Hyperaldosteronismus) das Risiko für Bluthochdruck, Herzversagen, Herzinfarkt oder Nierenversagen eindeutig erhöht [3–7]. Aldosteron wird hauptsächlich in der Nebenniere gebildet und bewirkt in der Niere die Rückresorption von Natrium und gleichzeitig die Sezernierung von Kalium. Somit ist Aldosteron direkt an der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts im Körper beteiligt, was maßgeblich den arteriellen Blutdruck beeinflusst.

1.1 Die Nebenniere

1.1.1 Aufbau und Funktion der Nebenniere

Die Nebennieren sind paarig angelegte, kappenartige Organe, die den oberen Polen der beiden Nieren aufliegen. In den menschlichen Nebennieren sind zwei Hormondrüsen vereint, die bei niederen Wirbeltieren noch als getrennte Organe auftreten: die Nebennierenrinde (NNR) und das Nebennierenmark (NNM). Beide Hormondrüsen haben verschiedene embryologische Ursprünge, verschiedene Funktionen und einen unterschiedlichen Aufbau. Die Zellen des Marks entstammen der Neuralleiste (Vorstufen sympathischer Neuronen) und sezernieren die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin. Die Rinde ist hingegen mesodermalen Ursprungs und kann sowohl morphologisch als auch funktionell in drei verschiedene Zonen gegliedert werden. Die äußerste Zone wird aufgrund ihrer knäuelähnlich gruppierten Zellen als Zona glomerulosa (Zg) bezeichnet, gefolgt von der Zona fasciculata (radiär gebündelte Zellen; Zf) und der Zona reticularis (Zr), die an das Nebennierenmark angrenzt. In allen drei Zonen der Nebennierenrinde werden ausgehend von Cholesterin Steroidhormone gebildet: Mineralokortikoide (Aldosteron) in der Zona glomerulosa, Glukokortikoide (Cortisol/ Corticosteron) in der Zona fasciculata und Androgene in der Zona reticularis. Wie bereits erwähnt, reguliert Aldosteron vor allem die Elektrolyt- und Wasserresorption in der Niere und somit auch Blutvolumen und Blutdruck. Glukokortikoide werden auch als „Stresshormone“ bezeichnet. Sie sind an vielen Stoffwechselvorgängen beteiligt, wie der Bereitstellung von Glukose und Fettsäuren, besitzen aber auch hemmende Wirkung auf das Immunsystem. Die funktionelle Gliederung der Nebennierenrinde beruht auf der Zonenspezifischen Expression steroidogener Enzyme. Die wichtigsten Enzyme sind dabei die

Aldosteronsynthese CYP11B2 und die 11 β -Hydroxylase CYP11B1, welche die letzten Schritte der Aldosteron- bzw. Cortisol/Corticosteron-Synthese katalysieren [8–10]. Während sich die Lokalisation der Aldosteronsynthese auf die Zona glomerulosa beschränkt [11–14], wird CYP11B1 ausschließlich in der Zona fasciculata exprimiert [15]. Bei einigen Spezies, wie Rind, Schwein und Schaf, übernimmt ein einzelnes Enzym (CYP11B1) die Synthese von Gluko- und Mineralokortikoiden [16–19].

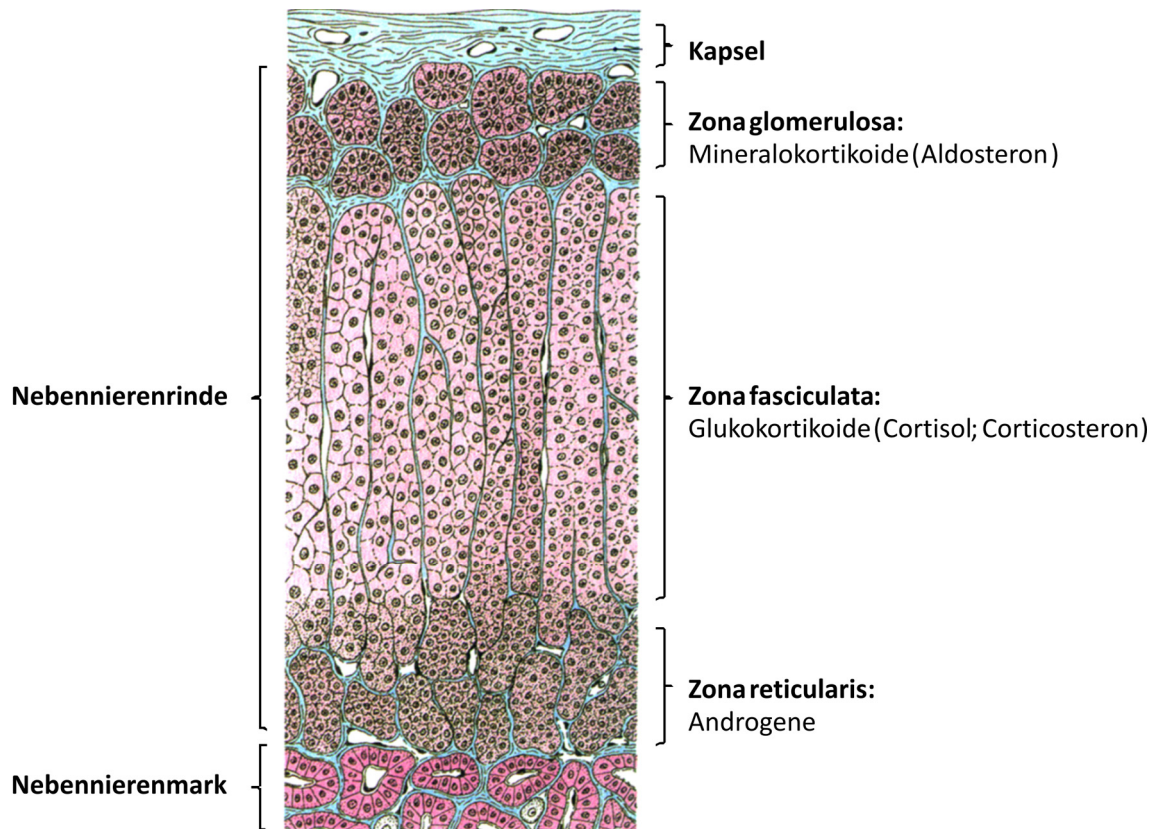


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Nebenniere

Die Abbildung zeigt einen Querschnitt durch die einzelnen Zonen der Nebenniere. Unterhalb der Kapsel befindet sich die Nebennierenrinde, die sich in Zona glomerulosa, fasciculata und reticularis gliedert. Danach folgt das Nebennierenmark, wo Katecholamine wie Adrenalin und Noradrenalin synthetisiert werden. Die Nebennierenrinde produziert hingegen Steroidhormone wie Aldosteron (Zona glomerulosa), Cortisol/Corticosteron (Zona fasciculata) und Androgene (Zona reticularis). Abbildung modifiziert nach [20].

1.1.2 Entwicklung der Nebenniere

Wie bereits erwähnt, entwickelt sich die Nebenniere aus zwei verschiedenen Anlagen, einem mesodermalen Anteil, der zur Nebennierenrinde wird und einem neuroektodermalen Anteil, der das Nebennierenmark bildet [21]. Das erste steroidogene Gewebe wird während der 4.-6. Schwangerschaftswoche sichtbar und wird als „adrenal primordium“ bezeichnet. Nach weiteren Differenzierungsvorgängen entsteht die erste Zonierung der fötalen Nebenniere. Es bildet sich die größere innere fötale Zone und die kleinere äußere definitive Zone, die zusammen von der

Nebennierenkapsel umschlossen werden. Außerdem konnte eine weitere Zellschicht zwischen fötaler und definitiver Zone nachgewiesen werden, die die Autoren als „transitional zone“ (Übergangszone) bezeichnen [22, 23]. Zu diesem Zeitpunkt wandern auch Zellen der Neuralleiste in den fötalen Nebennierencortex ein, die sich nach der Geburt zur Medulla entwickeln werden. Die Differenzierung der charakteristischen drei Rindenzonen beginnt ab der dreißigsten Schwangerschaftswoche. Dabei entwickeln sich aus der definitiven Zone und der Übergangszone erstmals Zellschichten, die der späteren Zona glomerulosa und Zona fasciculata ähneln. Nach der Geburt wird der fötale Cortex drastisch umstrukturiert: Die fötale Zone bildet sich innerhalb der ersten drei Monate zurück und die beiden übrigen Zonen bilden mehr und mehr die Strukturen der adulten Nebennierenrinde aus. Während die Zona glomerulosa und die Zona fasciculata bereits bei der Geburt vorhanden sind, ist die Zona reticularis erst ab dem dritten Lebensjahr zu erkennen [24–29]. Aufgrund des enzymatischen Expressionsprofils in der spätfötalen Entwicklungsphase geht man heute davon aus, dass sich die definitive, „transitional“ und fötale Zone später zur Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis entwickeln [22, 30–32]. Im Gegensatz zur humanen Nebenniere findet man bei der Maus auch nach der Geburt zwischen Cortex und Medulla eine Zone X, deren Ursprung wohl schon im fötalen Cortex liegt [33, 34]. Die fötale Zone bildet sich bei Mäusen bereits vor der Geburt stark zurück, allerdings vermutet man, dass die Zellen der Zone X von der fötalen Zone abstammen [35]. Bei männlichen Mäusen beginnt der Abbau der Zone X während der sexuellen Reifung, bei weiblichen Mäusen erst während der ersten Schwangerschaft [36].

1.2. Systemische Regulation und Wirkung von Aldosteron

1.2.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System reguliert bei Säugern als zentrales Kontrollelement den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt des Körpers und ist dadurch direkt an der Regulation des Blutvolumens und des Blutdrucks beteiligt. Die Protease Renin wird in den Epitheloidzellen des juxtaglomerulären Apparats der Niere synthetisiert und in Vesikeln gespeichert. Die Freisetzung von Renin in die Blutlaufbahn kann als Schlüsselereignis des RAAS bezeichnet werden und wird durch folgende Faktoren gesteuert: erniedrigter Perfusionsdruck in den Nierengefäßen, Abfall der NaCl-Konzentration an der Macula densa (Zellen des distalen Tubulus liegen benachbart zu den juxtaglomerulären, Renin-produzierenden Zellen) und Aktivierung der sympathischen Nierennerven durch β_1 -adrenerge Rezeptoren. Im Sinne einer negativen Feedback-Reaktion hemmt Angiotensin II (Ang II) hingegen die Reninfreisetzung.

Renin spaltet im Plasma von dem hauptsächlich in der Leber gebildeten Angiotensinogen ein Dekapeptid ab, das Angiotensin I (Ang I). Diese Reaktion ist der initiale und geschwindigkeitsbestimmende Schritt des RAAS. Erst die Abspaltung zweier weiterer Aminosäuren durch das Angiotensin-converting-enzyme (ACE) überführt das inaktive Angiotensin I in die biologisch aktive Form, das Angiotensin II. Das menschliche ACE ist in der Plasmamembran vieler Zellen verankert (hauptsächlich Endothel- und glatte Muskelzellen), kann aber auch in geringen Konzentrationen im Plasma gefunden werden. Weil Lunge und Niere eine besonders hohe Aktivität an ACE aufweisen, spielen sie für die Generierung von Angiotensin II eine wichtige Rolle. Angiotensin II als eigentlicher Mediator des RAAS besitzt verschiedene biologische Wirkungen, die in der Kontrolle des Extrazellulärvolumens und des Blutdrucks zusammenwirken. Es sind vier Ang II-Rezeptortypen beschrieben, von denen allerdings hauptsächlich der AT₁-Rezeptor die klassischen Ang II-Wirkungen vermittelt [37]: Vasokonstriktion, direkte Stimulation der Natriumresorption in der Niere, Aktivierung der ADH-Sekretion im Hypophysenhinterlappen, Steigerung des Durstgefühls und Salzappetits, Inhibierung der Reninausschüttung und Stimulation der Aldosteronproduktion in der Nebenniere. Aldosteron bewirkt in der Niere die Reabsorption von Natrium und gleichzeitig die Sezernierung von Kalium und Protonen. Da der Wasserhaushalt eng an den Elektrolythaushalt gekoppelt ist, reguliert Aldosteron maßgeblich die Volumenhomöostase und damit den Blutdruck des Körpers.

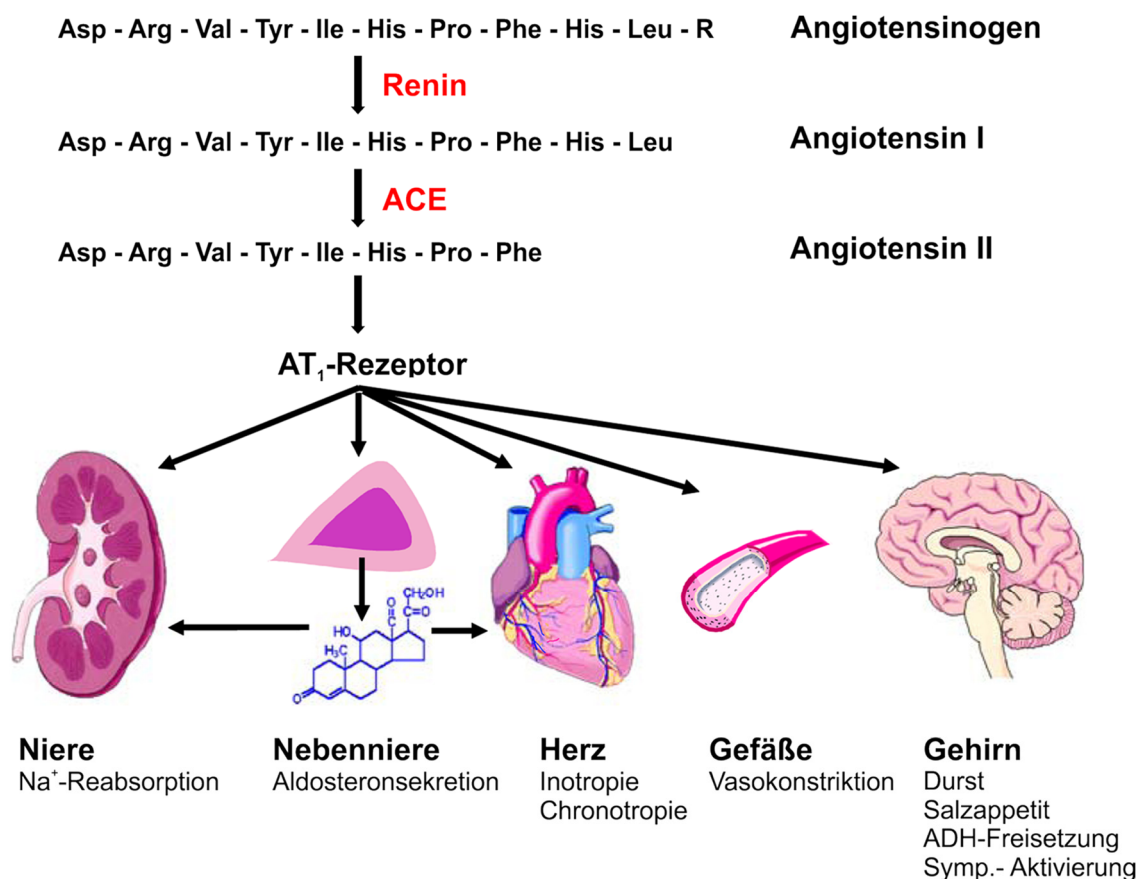


Abbildung 2: Das klassische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Dargestellt sind die typischen Komponenten des RAAS (proteolytische Enzyme in rot), ihre Interaktionen und Effekte auf das kardiovaskuläre System. Angiotensin II und Aldosteron vermitteln über direkte und indirekte Mechanismen ihre blutdrucksteigernde Wirkung in Organen wie Niere, Herz, Nebenniere, Blutgefäße und Gehirn. Abbildung modifiziert nach [38].

1.2.2 Wirkungen von Aldosteron

Die Hauptwirkungen von Aldosteron zielen auf eine Einsparung von Natrium ab, weswegen es an allen Epithelien wirkt, an denen Natriumionen ausgeschieden werden können. Neben Kolon, Schweißdrüsen und Speicheldrüsen sind der Hauptwirkungsort von Aldosteron der distale Tubulus und die kortikalen Abschnitte des Sammelrohrs in der Niere. Aldosteron vermittelt seine Wirkung über transkriptionelle (direkte) wie auch posttranskriptionelle (indirekte) Regulation folgender Proteine [39, 40]:

- SGK1 (serum and glucocorticoid inducible kinase) [41, 42]
- Natriumkanal ENaC zur luminalen Natriumaufnahme [43]
- $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in der basolateralen Membran [44, 45]
- Kaliumkanal ROMK zur Kaliumausscheidung [46]
- $\text{Na}^+/\text{H}^+\text{-Austauscher}$ NHE3 zur Na^+ -Absorption im Kolon [47]
- $\text{Na}^+/\text{Cl}^-\text{-Kotransporter}$ im distalen Tubulus [48]

Die Aldosteron-induzierte Transkription wird über den Mineralokortikoid-Rezeptor (MR) vermittelt, der in der Abwesenheit von Aldosteron in inaktiver Form im Cytosol liegt. Aufgrund seines lipophilen Charakters kann Aldosteron ungehindert die Zellmembran passieren und bindet an den Mineralokortikoid-Rezeptor. Nach einer Konformationsänderung löst sich dieser aus einem Multiproteinkomplex, dimerisiert und modifiziert im Zellkern die Transkription Aldosteron-regulierter Gene [49–51]. Um eine Stimulation des Mineralokortikoid-Rezeptors durch das strukturähnliche Cortisol (Corticosteron) zu vermeiden, exprimieren nahezu alle Epithelzellen das Enzym 11 β -HSD2, das Cortisol zu inaktivem Cortison (Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron) umsetzt [52, 53]. Eines der wichtigsten Aldosteron-induzierten Proteine ist neben den Ionentransportern die serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1, die bei Überexpression in *Xenopus laevis* Oozyten zu einer Aktivierung von ENaC führt. Zudem scheinen die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ und $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-\text{-Kotransporter}$ ebenfalls durch SGK1 reguliert zu werden [54–56]. Man vermutet, dass SGK1 durch Phosphorylierung des ENaC regulatory proteins (Nedd 4-2) dessen Bindung an den Natriumkanal reduziert und damit die ENaC-Degradation unterbindet [57]. In Folge dessen steigt die ENaC-Dichte und -Verweildauer in der apikalen Membran, was zu einer Erhöhung der

Natriumresorption und Kaliumsekretion führt. Gekoppelt an die Elektrolytaufnahme steigen durch Wassernachfluss das Plasmavolumen und damit der Füllungsdruck der Gefäße.

Neben der Expression in renalen Epithelzellen konnte der Mineralokortikoid-Rezeptor auch in anderen nicht epithelialen Geweben, wie dem Herzen [58], dem Hippocampus [59] und in Blutgefäßen [60] nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu seiner physiologischen Rolle als Mediator des Elektrolythaushalts scheint Aldosteron in anderen Geweben eher an pathophysiologischen Reaktionen (Kardiohypertrophie, kardiale Fibrose, Funktionsstörung des Gefäßendothels [61–64]) beteiligt zu sein. Im ZNS soll Aldosteron die Regulation von Blutdruck, Salzappetit und des sympathischen Nervensystems (Sympathikotonus) beeinflussen [65–69]. Aldosteroneffekte an Erythrozyten lassen außerdem eine Rezeptor-vermittelte Aldosteronsignalkaskade nicht ausschließen [70–72]. Unklar bleibt allerdings, ob es sich um eine membranständige Form des klassischen Mineralokortikoid-Rezeptors [73, 74], einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (ähnlich wie bei Progesteron und Östrogen) [75–77] oder um eine neue MR-Isoform handelt [70, 74, 78]. Obwohl MR-Blocker-unempfindliche Aldosteroneffekte mittlerweile in Leukozyten, Endothelzellen, Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten gefunden wurden [39, 73, 79], wirft deren physiologische Relevanz noch viele Fragen auf.

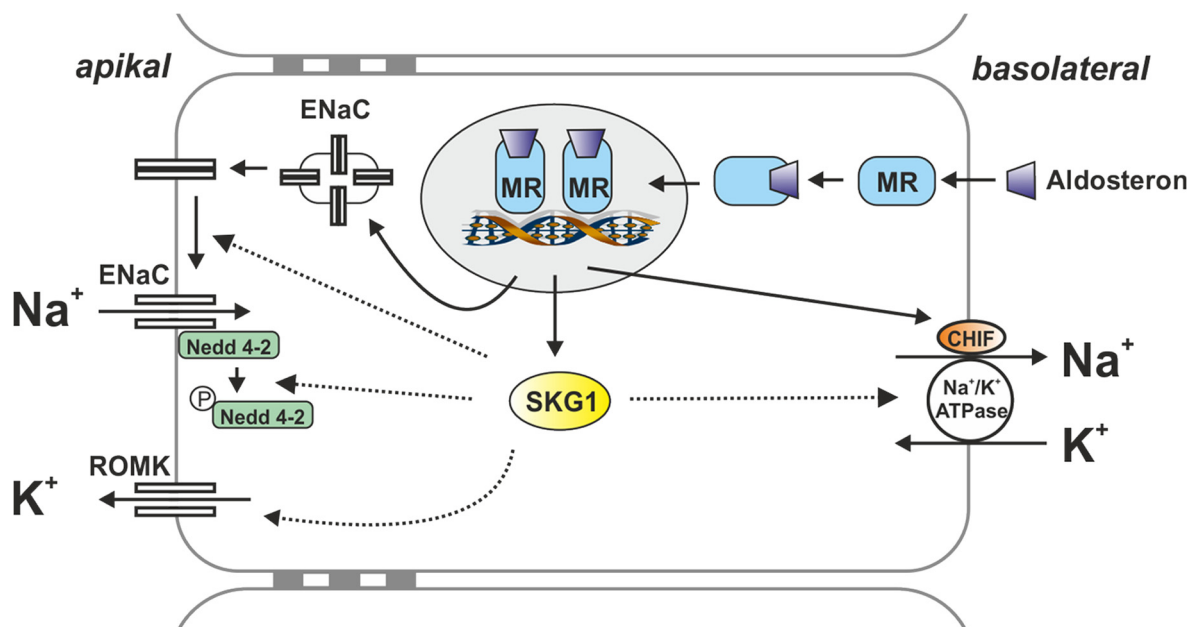


Abbildung 3: Vereinfachtes Schema der Aldosteron-induzierten Effekte zur Na⁺-Rückresorption in Tubuluszellen des distalen Nephrons

Dargestellt sind die Proteine, deren Gentranskription unter der Kontrolle des Aldosteron-MR-Komplexes steht, und ihre regulatorische Wirkung auf den epithelialen Na⁺- und K⁺-Transport. Die serum- und glucocorticoid-activated kinase (SGK) verhindert durch Phosphorylierung von Nedd 4-2 den Abbau des Natriumkanals ENaC in der apikalen Membran und aktiviert zudem den Kaliumkanal ROMK. Dadurch steigt die Na⁺-Resorption und K⁺-Sekretion. Die verstärkte Expression des Transmembranproteins corticosteroid hormone-induced factor (CHIF) erhöht außerdem die Na⁺-Affinität der Na⁺/K⁺-ATPase, was die Effektivität des Na⁺-Transports über die basolaterale Membran steigert [39, 40].

1.2.3 Syntheseweg von Aldosteron

Grundbaustein aller Steroidhormone ist das Cholesterin, das die Zellen der Nebennierenrinde entweder aus Acetat produzieren oder durch Endozytose der cholesterinreichen low-density-Lipoproteine (LDL) aufnehmen [80, 81]. In diesen Lipidtröpfchen liegt Cholesterin verestert vor und muss deshalb durch Cholesterinesterhydrolasen ins Cytosol freigesetzt werden. Die Steroidhormonsynthese beginnt in der Mitochondrienmatrix, weshalb Cholesterin zuerst durch das steroidogenic acute regulatory protein (StAR) von der äußeren Mitochondrienmembran zur inneren Mitochondrienmembran transportiert wird. StAR kann in allen Steroidhormonproduzierenden Geweben gefunden werden und spielt eine Schlüsselrolle in der Steroidbiosynthese [82]. Dies verdeutlicht eine eher seltene Form des Adrenogenitalen Syndroms bei dem betroffene Patienten durch Mutationen im StAR-Gen unfähig sind Steroidhormone in der Nebenniere und den Gonaden zu synthetisieren [83]. Ähnliche Symptome konnten in Mäusen nach Deletion des StAR-Gens beobachtet werden [84].

Nach Translokation ins Mitochondrium wird Cholesterin von CYP11A1 durch Abspaltung der Seitenkette und Einführung einer Ketogruppe am C₂₀-Atom zu Pregnenolon umgesetzt [85]. CYP11A1 gehört zur Familie der Cytochrom-P450-Enzyme (CYP), die neben einer Vielzahl von Dehydrogenasen maßgeblich an der Synthese von Steroidhormonen beteiligt sind. Eine Gemeinsamkeit aller P450-Enzyme ist die Häm-Gruppe im aktiven Zentrum und die Membranständigkeit. Nach Verlassen des Mitochondriums wird Pregnenolon am Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch die 3 β -HSD (3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase) zu Progesteron oxidiert. Beim Menschen konnten zwei 3 β -HSD-Isoformen (HSD3B1 und HSD3B2) identifiziert werden, während bei Maus und Ratte mehrere Isoenzyme zu finden sind [86–88]. Schließlich entsteht durch Hydroxylierung am C₂₁-Atom aus Progesteron 11-Desoxycorticosteron (11-DOC) [89]. In den Mitochondrien katalysiert die Aldosteronsynthase CYP11B2 zuletzt die Umsetzung von 11-Desoxycorticosteron zu Aldosteron. Dieser Prozess umfasst eine dreistufige Reaktion bestehend aus zwei Hydroxylierungen am C₁₁- und C₁₈-Atom gefolgt von der Oxidation der C₁₈-Hydroxylgruppe zur Aldehydgruppe [90].

CYP11B2 wird hauptsächlich in der Zona glomerulosa der Nebenniere gebildet, ihre Expression konnte aber auch in Herz, Gehirn und den Blutgefäßen nachgewiesen werden [60, 91, 92], wo Aldosteron möglicherweise als parakrines Hormon wirkt (vgl. Abschnitt 1.2.2). Die Aldosteronsynthase zeigt eine hohe Strukturähnlichkeit (93 %) zur 11 β -Hydroxylase (CYP11B1), dem Enzym, das in der Zona fasciculata für die Glukokortikoidsynthese verantwortlich ist [93]. CYP11B1 besitzt ebenfalls die katalytische Fähigkeit zur C₁₁- bzw. C₁₈-Hydroxylierung, was die Umsetzung von 11-Desoxycortisol zu Cortisol beim Menschen bzw. von 11-Desoxycorticosteron zu Corticosteron bei der Maus ermöglicht. Die Oxidation der C₁₈-Hydroxylgruppe wird allerdings

ausschließlich von CYP11B2 katalysiert, was die Aldosteronsynthese zum essentiellen Enzym für die Biosynthese von Aldosteron macht [94].

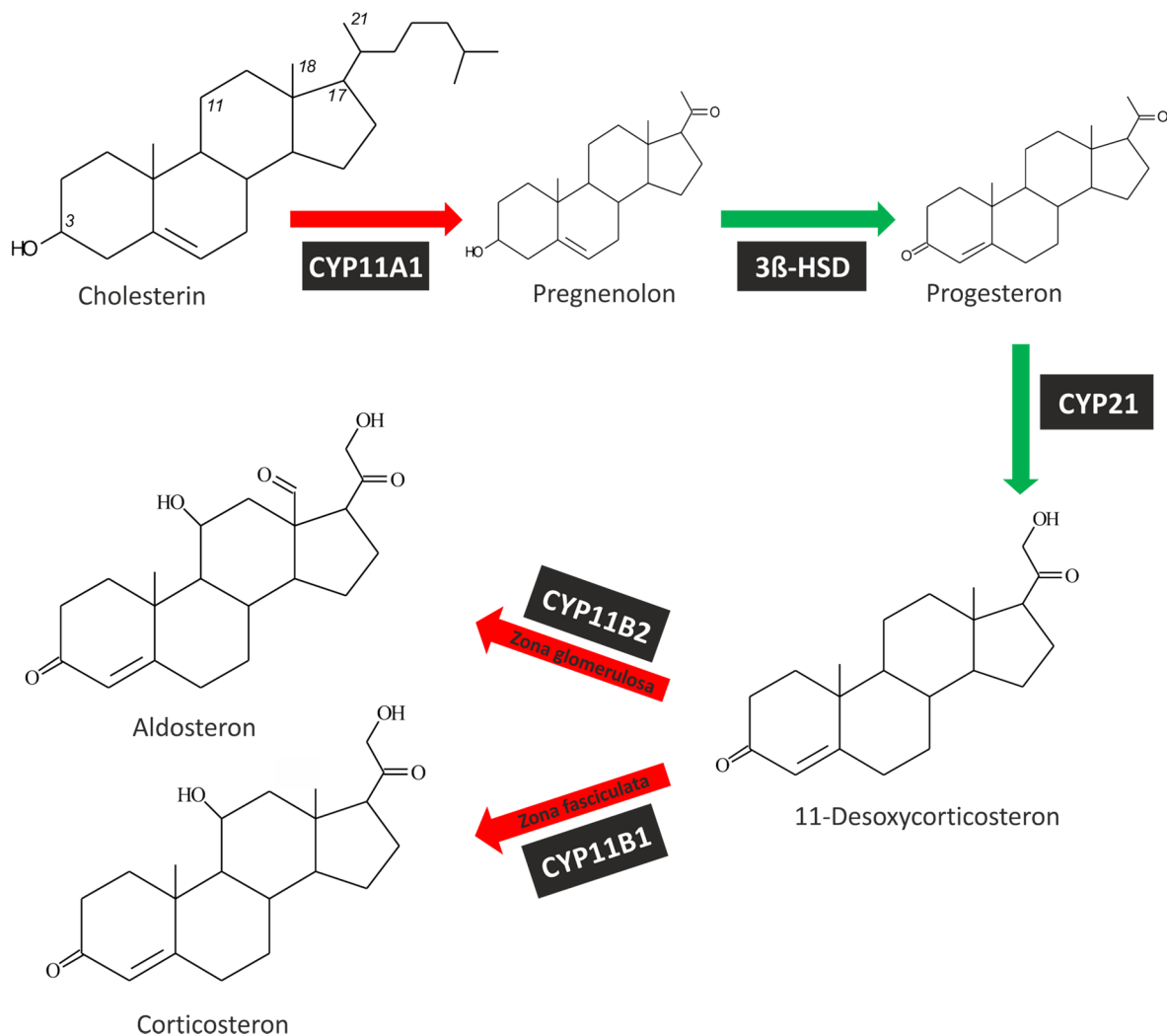


Abbildung 4: Syntheseweg von Aldosteron und Corticosteron bei der Maus

Cholesterin gelangt mit Hilfe des StAR-Proteins in die Mitochondrien. Dort katalysiert CYP11A1 die Umsetzung von Cholesterin zu Pregnenolon. Nach Oxidation zu Progesteron (3β-HSD) entsteht durch C₂₁-Hydroxylierung (CYP21) 11-Desoxycorticosteron. In den Zellen der Zona glomerulosa wird 11-Desoxycorticosteron in einer dreistufigen Reaktion durch die Aldosteronsynthese CYP11B2 zu Aldosteron umgesetzt. Die Zellen der Zona fasciculata produzieren aus 11-Desoxycorticosteron Corticosteron. (rote Pfeile markieren Reaktionen im Mitochondrium, grüne Pfeile Reaktionen im Endoplasmatischen Retikulum)

Man geht davon aus, dass Aldosteron ähnlich wie andere Steroidhormone nicht gespeichert wird, sondern direkt in den Blutkreislauf gelangt. Im Gegensatz zu Cortisol besitzt Aldosteron eine geringere Affinität zu Proteinen, weshalb bis zu 50 % des Hormons frei vorliegen (mögliche Bindung an Transcortin und Albumin). Der Aldosteronabbau findet hauptsächlich in der Leber statt. Dort wird Aldosteron zu Tetrahydroaldosteron und Aldosteron-18-Glucuronid metabolisiert und schließlich über die Niere ausgeschieden [95].

1.3 Pathophysiologie: Aldosteronbedingte Krankheitsbilder

Im folgenden Abschnitt soll die Bedeutung von Aldosteron für die Pathogenese menschlicher Erkrankungen näher beleuchtet werden. Dabei wird zuerst auf Krankheitsbilder eingegangen, deren Ursprung in einer fehlerhaften Regulation der Aldosteronsekretion liegt.

1.3.1 Ursachen und Folgen von Hyperaldosteronismus

Während im Jahr 2000 ca. 25 % der Weltbevölkerung unter Bluthochdruck litten, rechnet man bis 2025 mit einer Steigerung auf bis zu 29 % [96]. Klinische Studien belegen, dass Erhöhungen des Plasmaaldosteronlevels und der Aldosteron-Renin-Ratio (ARR) häufig mit dem Auftreten von Bluthochdruck korrelieren bzw. Vorboten einer entstehenden Hypertonie sind [97, 3, 98]. Grundsätzlich unterscheidet man zwei Formen des Hyperaldosteronismus:

Primärer Hyperaldosteronismus (PA) entsteht durch weitgehend autonome, Renin-Angiotensin-System(RAS)-unabhängige Aldosteronproduktion in der Nebenniere, während der sekundäre Hyperaldosteronismus als Folge einer inadäquat hohen Reninausschüttung entsteht. Primärer Hyperaldosteronismus ist die häufigste Ursache der sekundären Hypertonie und tritt bei 6-12 % aller Bluthochdruckpatienten auf [99–101]. Typische Symptome sind: hohe Plasmaaldosteronkonzentration, Bluthochdruck durch gesteigerte Na^+ - und H_2O -Retention im Sammelrohr der Niere, reduzierte RAS-Aktivität, erhöhte Aldosteron-Renin-Ratio, Hypokaliämie und metabolische Alkalose [102]. Zudem weisen PA-Patienten ein erhöhtes Risiko für Herzversagen, Herzinfarkt und Niereninsuffizienz auf [4–7, 103]. Hauptursachen für primären Hyperaldosteronismus sind Aldosteron-produzierende Adenome (APA) in der Nebennierenrinde und eine bilaterale Hyperplasie der Nebenniere. In einzelnen Fällen treten PA-spezifische Symptome aufgrund autosomal dominant vererbter Gendefekte auf (familiar hyperaldosteronism, FH). Bei FH Typ I führt die fehlerhafte Rekombination zum Austausch der regulatorischen Einheit des CYP11B2-Gens durch die des CYP11B1-Gens, wodurch die Aldosteronproduktion in pathologischem Ausmaß unter der Kontrolle von ACTH steht [104]. Während der FH Typ II mit einer noch unbekannten Veränderung in der Chromosomenregion 7p22 in Verbindung gebracht wird [105, 106], konnten kürzlich Mutationen im Kaliumkanal KCNJ5 als Ursache für den FH Typ III und die APA-Entwicklung ausgemacht werden [107, 108].

Sekundärer Hyperaldosteronismus wird auch als Hyperreninismus bezeichnet, da die erhöhten Plasmaaldosteronwerte die Folge einer gesteigerten Reninausschüttung sind. Im Gegensatz zum primären Hyperaldosteronismus ist hier die Aldosteron-Renin-Ratio nicht erhöht. Mögliche Ursachen können eine gedrosselte Nierendurchblutung durch Nierenarterienstenose, Abfall der Nierenperfusion bei Herzinsuffizienz oder in seltenen Fällen ein Tumor der juxtaglomerulären Zellen sein [109, 110].

1.3.2 Hypoaldosteronismus

Beim Hypoaldosteronismus handelt es sich um ein relativ seltenes Krankheitsbild, das sich durch eine verminderte Biosynthese von Aldosteron auszeichnet. Ursache kann eine primäre Nebenniereninsuffizienz (Morbus Addison) oder ein Enzymdefekt in der Steroidbiosynthese sein. Klassische Symptome sind Natriumverlust, Hyperkaliämie, metabolische Azidose und arterielle Hypotonie. Beispielsweise sind CYP11B2-Mutationen bekannt, die die katalytische Effektivität des Enzyms stark beeinflussen, weshalb dieses Krankheitsbild auch als Aldosterone Synthase Deficiency (ASD) oder Corticosterone Methyloxidase Deficiency (CMO) bezeichnet wird. CMO kann in zwei Formen auftreten: Bei CMO I ist die katalytische Aktivität von CYP11B2 auf die C₁₁-Hydroxylierung beschränkt (Produkt: Corticosteron), während bei CMO II weiterhin die Fähigkeit zur C₁₈-Hydroxylierung besteht (Produkt: 18-Hydroxycorticosteron) [111]. Unter dem Begriff Pseudohypoaldosteronismus fasst man Krankheitsbilder zusammen, deren Symptome denen des Hypoaldosteronismus ähneln, ihre Ursache allerdings nicht in einer gestörten Steroidsynthese haben. Dazu zählen Mutation im Gen des Mineralokortikoid-Rezeptors oder des Natriumkanals ENaC, der im Sammelrohr der Niere hauptsächlich die Aldosteron-induzierte Natriumrückresorption bewerkstelligt [112].

1.4 Zelluläre Regulation der Aldosteronsekretion

Die Regulation der Aldosteronsekretion auf zellulärer Ebene kann grundsätzlich in zwei Phasen eingeteilt werden [113, 114]. In der *acute phase* (wenige Minuten nach Stimulation) wird die Aldosteronproduktion durch den gesteigerten Transport von Cholesterin in die Mitochondrien reguliert, indem die Aktivität des StAR-Proteins steigt [115–118]. In der *chronic phase* (Stunden bis Tage) bestimmt hingegen die Transkriptionsrate der CYP11B2 die Aldosteronsynthese [119]. Hauptstimuli zur Aldosteronproduktion sind Angiotensin II und eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration, während ACTH physiologischerweise nur eine untergeordnete Rolle spielt. Durch Angiotensin II und Hyperkaliämie kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, was das entscheidende Signal zur Aldosteronproduktion darstellt.

1.4.1 Regulation durch Angiotensin II

Angiotensin II bindet an den in der Nebenniere exprimierten Ang II-Rezeptor Typ 1 (AT₁), wodurch über unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden folgende Aldosteron-fördernde Prozesse ausgelöst werden:

- (1) Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern wie dem Endoplasmatischen Retikulum
- (2) Inhibierung von K_2P -Kaliumkanälen (Depolarisation der Plasmamembran)
- (3) Öffnung von membranständigen Ca_v -Kanälen durch direkte, Ang II-vermittelte Senkung der Aktivierungsschwelle und durch Depolarisation der Zellmembran
- (4) Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Levels und Aktivierung von Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (CamK)
- (5) Phosphorylierung von CYP11B2-spezifischen Transkriptionsfaktoren

Am besten beschrieben sind dabei die zellulären Mechanismen, die die transiente Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum ins Cytosol bewirken. Nach Ang II-Rezeptorbindung kommt es zur G_q -Protein-gekoppelten Aktivierung der Phospholipase C (PLC), was die Freisetzung von Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) zur Folge hat [120–126]. Während Inositoltriphosphat über die Öffnung IP_3 -empfindlicher Ca^{2+} -Kanäle im Endoplasmatischen Retikulum die Aldosteronproduktion fördert [127], bleibt die Rolle von Diacylglycerin und der DAG-aktivierten Proteinkinase C (PKC) kontrovers diskutiert.

Um das cytosolische Ca^{2+} -Level dauerhaft zu erhöhen, aktivieren weitere Ang II-abhängige Signalkaskaden zusätzliche Ca^{2+} -Influx-Wege. Wichtigster Angriffspunkt sind dabei die spannungsaktivierten Ca^{2+} -Kanäle, deren Expression und Ang II-induzierte Kanalöffnung schon früh in Zellen der Zona glomerulosa von Ratte und Rind nachgewiesen wurden [128–131]. Ausschlaggebend für die Kanalaktivierung ist dabei eine Depolarisation der Plasmamembran, wobei T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle bereits bei geringeren Potentialänderungen öffnen als L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle [132]. Das Ruhemembranpotential einer Glomerulosazelle liegt, bedingt durch eine hohe Kaliumleitfähigkeit, unter physiologischen Bedingungen bei ca. -80 mV, was dem Kaliumgleichgewichtspotential (-90mV) sehr nahe kommt [133–135]. Unter diesen stark hyperpolarisierten Bedingungen ist die Offenwahrscheinlichkeit spannungsaktivierter Ca^{2+} -Kanäle äußerst gering [133, 136]. Ursächlich für die hohe Kaliumhintergrundleitfähigkeit ist die Expression der K_2P -Kaliumkanäle Task1 (KCNK3) und Task3 (KCNK9) in der Zona glomerulosa [137–139].

Die Aktivierung des AT_1 -Rezeptors vermittelt, vermutlich über die Phospholipase C und Diacylglycerin (Prof. Dr. Dominik Oliver, Universität Marburg, unveröffentlichte Daten), die Inhibierung von Task-Kanälen und induziert dadurch eine Depolarisation (ca. 10 mV) der Zellmembran. T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle öffnen sich, Ca^{2+} strömt in die Zelle und induziert die Aldosteronproduktion. Zusätzlich soll Angiotensin II über G-Proteine (G_i) direkt die Kanalaktivität der T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle beeinflussen, indem es deren Spannungsempfindlichkeit senkt [140]. Eine ähnliche Wirkung wird der Phosphorylierung von T-Typ- Ca^{2+} -Kanälen durch die Ca^{2+} -aktivierte CaM-Kinase II zugeschrieben [141–144]. Im Gegensatz zu T-Typ- Ca^{2+} -Kanälen scheinen L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle durch physiologische Ang II-Konzentrationen inhibiert zu werden, was die Zelle

möglicherweise vor einer Ca^{2+} -Überladung schützt [145]. Es wird allerdings vermutet, dass L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (Interaktion mit IP_3 -Rezeptoren) am initialen, IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Anstieg beteiligt sind [146, 147]. Neuere Studien an murinen Nebennierenschnitten beschreiben spontane, oszillatorische Depolarisationen in Glomerulosazellen, deren Frequenz durch Angiotensin II und K^+ erhöht wird. Die Autoren spekulieren, dass die elektrische Oszillation der Zellen für einen stabilen, frequenzgesteuerten Ca^{2+} -Einstrom durch T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle sorgt [148, 149].

Der Anstieg des intrazellulären Gehalts an Ca^{2+} -Ionen aktiviert CaM-Kinasen, die durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie dem cAMP response element binding protein (CREB) sowohl die Expression von CYP11B2 als auch von StAR [150, 151] steuern (siehe Kapitel 1.4.3). Neben der essentiellen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration steuert Angiotensin II noch folgende andere Mechanismen, die indirekt zur Aldosteronproduktion beitragen: (1) Erhöhung der StAR-Expression und -Phosphorylierung durch DAG-aktivierte PKC und PKD [118, 152, 153]; (2) PKC-abhängige Inhibierung der CYP17-Expression in der Zona glomerulosa [154, 155]; (3) inhibitorische Wirkung auf die Na^+ - K^+ -ATPase [156]; (4) Erhöhung der Expression von LDL- und HDL-Rezeptoren bzw. Enzymen der Cholesterinsynthese [157, 158]; (5) Expansion der Zona glomerulosa durch Hypertrophie und Hyperplasie [155, 159, 160].

1.4.2 Regulation durch extrazelluläres Kalium

Aufgrund der charakteristischen Kaliumhintergrundleitfähigkeit, bedingt durch die hohe Dichte an K_2P -Kaliumkanälen, beeinflusst die extrazelluläre Kaliumkonzentration maßgeblich das Membranpotential der Zellen der Zona glomerulosa. Bei Hyperkaliämie depolarisiert die Zellmembran, spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle öffnen und das intrazelluläre Ca^{2+} steigt.

Bereits bei Änderungen von 0,5 mM $[\text{K}^+]$ ist eine interzelluläre Ca^{2+} -Antwort messbar [161]; eine Erhöhung der physiologischen Kaliumkonzentration von 3,6 auf 4,6 mM verdoppelt sogar die Aldosteronproduktion [162]. Bis zu einer Konzentration von 6 mM $[\text{K}^+]$ scheinen fast ausschließlich T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle aktiv zu sein, deren Aktivierungspotential zwischen -80 mV und -70 mV liegt [145]. L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (Aktivierungspotential ca. -57 mV) steuern den Ca^{2+} -Einstrom erst ab einer Konzentration über 6 mM $[\text{K}^+]$.

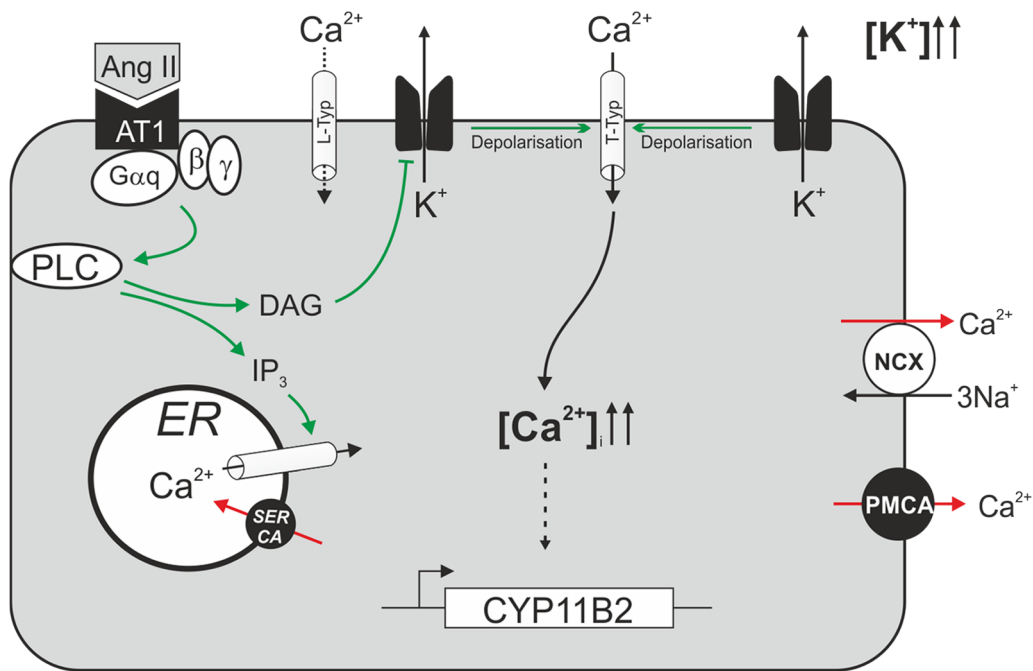


Abbildung 5: Regulation der CYP11B2-Transkription durch Angiotensin II und Kalium in Zellen der Zona glomerulosa
 Angiotensin II und K^+ stimulieren die Transkription der Aldosteronsynthese über eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts. Die dabei beteiligten zellulären Signalkaskaden sind in grün dargestellt (Details siehe Text). Zusätzlich besitzt die Zelle Mechanismen, die vor Ca^{2+} -Überladung schützen (rote Pfeile): Ca^{2+} -Export über den Na^+/Ca^{2+} -Austauscher NCX [163, 164], aktiver Ca^{2+} -Transport mittels Plasmamembran Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) [165] und Ca^{2+} -Rücktransport ins Endoplasmatische Retikulum durch die SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase) [166].

1.4.3 Calcium-induzierte CYP11B2-Transkription

Angiotensin II und K^+ steuern die CYP11B2-Transkription über einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Entscheidend ist dabei die Aktivierung von Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinasen, besonders CaMK I und CaMK IV [150]. Deren Aufgabe liegt in der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie NURR1 (NGFIB), ATF-1, ATF-2 und CREB, die spezifische *cis*-Elemente in der CYP11B2-Promotorregion binden und damit die Transkription aktivieren. Durch Mutationsanalysen konnten drei konservierte regulatorische *cis*-Elemente im CYP11B2-Promotor bestimmt werden: ein cAMP response element (CRE), Ad5 und NBRE [119, 167–172]. CRE-Elemente (aktiviert durch ATF-1/2, CREB) findet man in der Promotorregion von hCYP11B2, aber auch von hCYP11B1. Dementsprechend scheint die zonenspezifische Regulation der CYP11B2-Transkription hauptsächlich von den *cis*-Elementen Ad5 und NBRE abhängig zu sein. Im Gegensatz dazu verhindert die Überexpression des Transkriptionsfaktors SF-1, der andere Gene der Steroidbiosynthese (StAR, CYP11A, CYP11B1, CYP17) positiv reguliert, die CYP11B2-Expression [173, 174]. Zusätzlich stimuliert Ca^{2+} die Cholesterinverfügbarkeit durch Aktivierung der Cholesterinesterhydrolasen (mittels MAP-Kinasen), die Mobilisierung von Cholesterin zur äußeren Mitochondrienmembran, den Transfer von Cholesterin in die Mitochondrienmatrix mittels StAR und die Bereitstellung von NADPH (Cofaktor aller CYP-Enzyme) in den Mitochondrien [175–180].

1.5 Kaliumkanäle in der Nebenniere

Die Hauptstimuli der Aldosteronproduktion, Angiotensin II und Kalium, lösen beide in Zellen der Zona glomerulosa eine Depolarisation der stark hyperpolarisierten Plasmamembran aus. Elektrophysiologische Untersuchungen wiesen eine Ang II-hemmbar, potentialbestimmende Kaliumhintergrundleitfähigkeit in Glomerulosazellen nach [131, 135, 181, 182], die Mitgliedern der K_2P -Kaliumkanalfamilie zugeschrieben werden konnte. Diese Kanäle zeichnen sich durch eine geringe Spannungsabhängigkeit aus, weshalb sie auch unter hyperpolarisierten Bedingungen geöffnet bleiben. Funktionelle K_2P -Kanäle werden aus zwei Untereinheiten gebildet, die jeweils aus zwei porenbildenden und vier Transmembrandomänen bestehen. Während in Nebenniere von Maus und Ratte hauptsächlich zwei Vertreter der TWIK-related acid sensitive K^+ -Kanäle (Task), Task1 und Task3, potentialbestimmend sind, scheint in bovinen Nebennieren Trek1 diese Funktion zu übernehmen [183–185]. In humanen Nebennierenadenomen konnten kürzlich Mutationen in dem $G_{\beta\gamma}$ -aktivierten, einwärtsgerichtenden Kaliumkanal KCNJ5 als Ursache für Hyperaldosteronismus nachgewiesen werden [108]. Die Rolle des KCNJ5-Kanals in nativem humanem Nebennierengewebe bleibt allerdings noch weitgehend ungeklärt.

Neben den K_2P -Kanälen findet man in Glomerulosazellen auch spannungsaktivierte (KCNQ1) und Ca^{2+} -aktivierte (KCNMA1) Kaliumkanäle [131, 182]. Da diese Kaliumkanäle unter hyperpolarisierten Bedingungen geschlossen bleiben, schreibt man ihnen eine repolarisierende Wirkung zu, die der Ang II-vermittelten Depolarisation entgegenwirkt und somit die Aldosteronproduktion limitiert. In der nachfolgenden Tabelle sind die wichtigsten Kaliumkanäle der Nebenniere und ihre Eigenschaften kurz zusammengefasst (modifiziert nach [186]).

Kanal	Eigenschaft	Pathophysiologie	Spezies	Quellen
Task1 (KCNK3)	Aufrechterhalten des Ruhemembranpotentials; Inhibierung durch H^+ und Ang II	Geschlechtsabhängiger Hyperaldosteronismus in Task1 ^{-/-} Mäusen durch Cyp11b2-Expression in der Zf	Ratte Maus Mensch	[108] [139] [183] [187]
Task3 (KCNK9)	Aufrechterhalten des Ruhemembranpotentials; Inhibierung durch H^+ und Ang II; möglicherweise Heterodimere mit TASK1	Primärer Hyperaldosteronismus in Task1 ^{-/-} / Task3 ^{-/-} Mäusen und Task3 ^{-/-} Mäusen	Ratte Maus Mensch	[108] [137] [139] [188–191]
Trek1 (KCNK2)	Aufrechterhalten des Ruhemembranpotentials; Inhibierung durch ACTH und Ang II	unbekannt	Rind Maus Mensch	[185] [192–196]
KCNJ5 (Kir3.4/GIRK4)	Expression in der Zg und APAs; Funktion des WT-Kanals nicht eindeutig geklärt	Mutation in APAs und familiärem primären Hyperaldosteronismus	Mensch Schwein	[108] [135] [197] [198]
Kcnq1 (K _v 7.1)	Repolarisation des Membranpotentials nach Ang II-induzierter Depolarisation; regulatorische Untereinheit KCNE1	Kcnq1 ^{-/-} Maus: erniedrigte Plasmaaldosteronwerte Kcne1 ^{-/-} Maus: erhöhte Plasmaaldosteronwerte	Maus Mensch	[108] [199] [200]
MaxiK (KCNMA1/KCNMB1)	Repolarisation des Membranpotentials; ANP-stimulierte Öffnung und Inhibierung der Aldosteronproduktion	Kcnma1 ^{-/-} Maus: Hyperaldosteronismus	Maus Mensch	[201–204]

1.6 Hyperaldosteronismus durch Störungen der zellulären Regulation

Primärer Hyperaldosteronismus resultiert aus einer Fehlregulation der Kontrollmechanismen, die die Aldosteronproduktion in der Zona glomerulosa der Nebenniere steuern und zeichnet sich durch eine Autonomie der adrenalen Steroidsynthese aus. Die Aldosteronsekretion wird durch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert, ausgelöst durch eine Membrandepolarisierung der Glomerulosazellen [205]. Die Aufrechterhaltung eines hyperpolarisierten Ruhemembranpotentials (-70 bis -80 mV) ist dementsprechend von entscheidender Bedeutung. Aufgrund der in Kapitel 1.5 beschriebenen Expression von K_2P -Kanälen bestimmt in Glomerulosazellen die Kaliumleitfähigkeit hauptsächlich das Membranpotential. Funktionsdefekte potentialbestimmender Kaliumkanäle können somit drastische Auswirkungen auf das Ruhemembranpotential der Aldosteron-produzierenden Zellen haben und beispielsweise eine chronische Depolarisation der Plasmamembran verursachen. Der folgende Abschnitt befasst sich daher mit der Rolle der Kaliumkanäle bei der Pathogenese des primären Hyperaldosteronismus.

1.6.1 Hyperaldosteronismus durch Deletion von Task-Kanälen in Mäusen

In Zellen der Zona glomerulosa wird das Membranpotential hauptsächlich durch die Expression von Task-Kanälen bestimmt, die den charakteristischen K^+ -Hintergrundstrom erzeugen. Unter den bekannten Mitgliedern der Task-Familie findet man in der Nebennierenrinde der Maus die höchste Expression für Task1 und Task3 [137, 139, 183, 187, 188, 190, 191]. Färbungen mittels in-situ-Hybridisierung zeigen Task1-mRNA in der Zona glomerulosa und Zona fasciculata, während die Task3-mRNA in der Zona glomerulosa und der Medulla zu finden ist [139, 186, 188]. Neuere Befunde deuten auf eine Testosteron-abhängige Task3-Expression in den äußeren Zellschichten der Zona fasciculata [190]. Wie auch andere Kanäle der K_2P -Familie, sind Task-Kanäle aus zwei dimerisierten Untereinheiten aufgebaut. Im heterologen Expressionssystem (Oozyten) wurden sowohl Ströme von Task1- oder Task3-Homodimeren als auch von Task1/Task3-Heterodimeren nachgewiesen [189]. Noch ist unklar, ob Task1 und Task3 in nativem Nebennierengewebe als Homo- oder Heterodimere auftreten. Die funktionelle Relevanz der Task-Kanäle für die Regulation der Aldosteronsynthese wurde in den letzten Jahren durch Arbeiten an drei verschiedenen Mausmodellen untersucht: Die Task1 knockout Maus ($\text{Task1}^{-/-}$), die Task1/Task3 doppel-knockout Maus ($\text{Task1}^{-/-}/\text{Task3}^{-/-}$) und die Task3 knockout Maus ($\text{Task3}^{-/-}$). Alle Mausmodelle wiesen eine erhöhte Aldosteronsekretion auf, allerdings mit deutlichen pathophysiologischen Unterschieden. Die Deletion von Task1 bewirkte eine Depolarisation (8mV) der adrenokortikalen Zellen mit ektopter, geschlechtsspezifischer Expression der Aldosteronsynthase in der Zona fasciculata weiblicher $\text{Task1}^{-/-}$ Mäuse [187]. Aufgrund der Fehllokalisation der Aldosteronsynthase in der Zona

fasciculata wird die Aldosteronproduktion in diesen Tieren hauptsächlich durch ACTH anstelle von Angiotensin II reguliert. Dementsprechend war der Hyperaldosteronismus in weiblichen Task1^{-/-} Mäusen Glukokortikoid-behandelbar. Die adrenale Fehlzonierung der Aldosteronsynthese trat in männlichen Task1^{-/-} Mäusen nur vor der Pubertät auf, weshalb unsere Arbeitsgruppe eine Androgen-vermittelte Erhöhung der Task3-Expression in adulten männlichen Task1^{-/-} Mäusen als möglichen Kompensationsmechanismus vorschlug. TASK1 scheint auch in humanem Nebennierengewebe der am stärksten exprimierte Vertreter der TASK-Familie zu sein [108]. In-vitro-Experimente mit TASK1-siRNA an humanen, adrenokortikalen Zellen belegen eine Zunahme an intrazellulärem Ca²⁺, der StAR- und CYP11B2-Expression sowie der Pregnenolon- und Aldosteronproduktion [206].

Ähnlich wie bei adulten männlichen Task1^{-/-} Mäusen, war in Task1^{-/-}/Task3^{-/-} Mäusen die Cyp11b2-Expression überraschenderweise weitgehend auf die Zona glomerulosa beschränkt. Der komplette Verlust der Task-Leitfähigkeit (Depolarisation um 20 mV) führte in Task1^{-/-}/Task3^{-/-} Mäusen zu erhöhter Aldosteronsekretion, die auch unter Hoch-Na⁺-Diät nicht abnahm [139]. Die fehlende Normalisierung der Aldosteronwerte unter Candesartan-Behandlung (AT₁-Rezeptor Blocker) und eine erniedrigte Plasmareninkonzentration sprechen für eine autonome Aldosteronproduktion in Task1^{-/-}/Task3^{-/-} Mäusen, die nicht länger unter Ang II-Kontrolle steht.

Die alleinige Deletion von Task3 bewirkte nach Guagliardo *et al.* einen im Vergleich zu Task1^{-/-} und Task1^{-/-}/Task3^{-/-} Mäusen eher milden Hyperaldosteronismus mit einer salzempfindlichen Hypertonie [191]. Die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an der Task3^{-/-} Maus können diese Befunde nur teilweise bestätigen. Trotz ausgeprägter Störungen auf zellulärer Ebene (Depolarisation der adrenokortikalen Zellen um ca. 25 mV und Störungen der Ca²⁺-Homöostase in Form von spontanen Oszillationen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration) wurden im Gegensatz zu Guagliardo *et al.* unter Kontrollbedingungen keine erhöhten Plasmaaldosteronwerte gemessen [190]. Allerdings war in Task3^{-/-} Mäusen eine auf das Aldosteron bezogene, supprimierte Plasmareninkonzentration zu beobachten, was zumindest für eine partiell Ang II-unabhängige Aldosteronproduktion spricht und ein Kennzeichen autonomer Sekretion ist. Die Reduktion der Renin-Angiotensin-kontrollierten Aldosteronsekretion in Task3^{-/-} Mäusen dient möglicherweise zur Kompensation der autonomen Aldosteronproduktion, weshalb sich die absoluten Plasmaaldosteronwerte von Task3^{-/-} und Wildtypmäusen unter Kontrollbedingungen nicht unterscheiden. Interessanterweise wurden bei Untersuchungen des adrenalen Phänotyps der Task3^{-/-} Maus während der postnatalen Entwicklung in ein Tage alten Mäusen (1d) pathologisch hohe Aldosteronwerte gemessen, begleitet von einer erhöhten Na⁺-Konzentration im Plasma [207, 208]. Vermutlich entwickeln Task3^{-/-} Mäuse innerhalb der ersten beiden Lebenswochen kompensatorische Regulationsmechanismen, die dem Hyperaldosteronismus entgegenwirken.

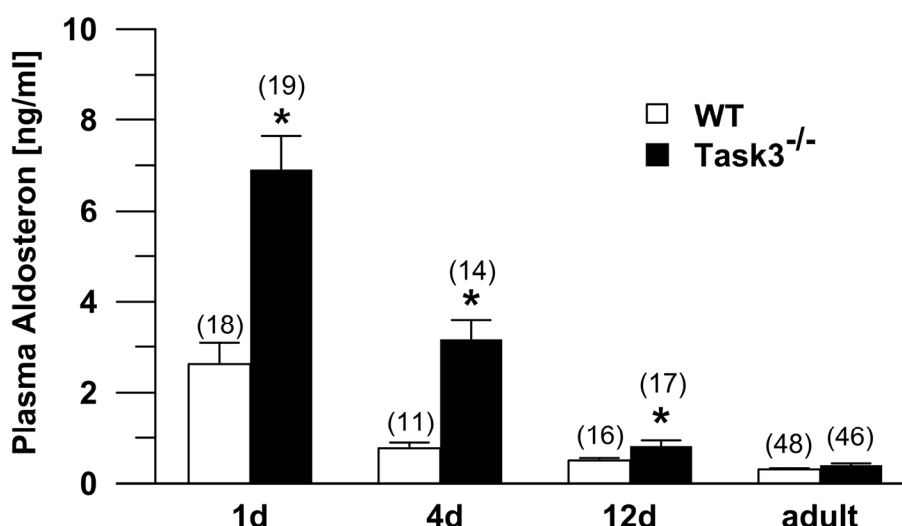


Abbildung 6: Plasmaaldosteron in jungen Task3^{-/-} Mäusen [207, 208]

Dargestellt ist der altersabhängige Verlauf der Aldosteronkonzentration im Plasma von Wildtypmäusen und Task3^{-/-} Mäusen. Der Task3-knockout verursacht demnach bei jungen Mäusen einen Hyperaldosteronismus, der in adulten Tieren kompensiert werden kann. *bedeutet statistisch signifikant verschieden zwischen Task3^{-/-} und Wildtyp; die Zahl in Klammern (n) gibt die Anzahl der Tiere pro Gruppe an.

1.6.2 KCNJ5-Mutationen als Ursache für Hyperaldosteronismus beim Menschen

Trotz eindeutiger Befunde in knockout Mausmodellen, die Veränderungen im TASK1- und TASK3-Gen als mögliche Ursache von primärem Hyperaldosteronismus beim Menschen vorschlagen, konnten bislang keine TASK-Mutationen in PA-Patienten nachgewiesen werden. Eine amerikanische Studie bestätigt allerdings eine mögliche Assoziation zwischen TASK3-Genvariationen und dem entstehende Risiko für Hyperaldosteronismus und Hypertension [209]. Die molekulare Pathophysiologie von Aldosteron-produzierenden Adenomen blieb lange ungeklärt, bis Choi *et al.* 2011 somatische Mutationen (G151R; L168R) im einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanal KCNJ5 in 8 von 22 Aldosteron-produzierenden Adenomen als Ursache für primären Hyperaldosteronismus beschrieben [108]. Eine dritte Mutation (T158A) wurde in der Keimbahn einer unter PA-leidenden Familie identifiziert. Alle KCNJ5-Mutationen führen zu einem Aminosäureaustausch nahe dem Selektivitätsfilter, der in der porenbildenden Region ein unter Kaliumkanälen konserviertes Gly-Tyr-Gly-Motiv (GYG) aufweist. Elektrophysiologische Untersuchungen offenbarten einen pathologischen Na⁺-Einwärtsstrom in Zellen mit KCNJ5-Mutationen, der im Vergleich zum KCNJ5 WT-Strom nicht durch Ba²⁺ (K⁺-Kanal Blocker) hemmbar war. Durch die pathologische Na⁺-Leitfähigkeit nähert sich das Ruhemembranpotential dem Na⁺-Gleichgewichtspotential (+61 mV) an, was folglich zu einer chronischen Depolarisation der adrenokortikalen Zellmembran führte. Choi *et al.* postulierten, dass der daraus resultierende Ca²⁺-Einstrom die Aldosteronproduktion und Zellproliferation aktiviert, die letztendlich die Adenombildung fördert [108].

Seit der ersten Veröffentlichung konnten weitere somatische KCNJ5-Mutationen in Aldosteron-produzierenden Adenomen (T158A [210]; I157del [211]; E145Q [212]; E145K [213]) wie auch KCNJ5-Keimbahnmutationen gefunden werden (G151R und G151E [210, 214]; I157S [215]; Y152C [216]). In westlichen Länder treten somatische Mutationen durchschnittlich in ca. 40 % der untersuchten Aldosteron-produzierenden Adenome auf, während es in Asien bis zu 65 % sind [211, 212, 217–221].

Trotz der gut belegten Relevanz von KCNJ5-Mutationen bei der Pathogenese von primärem Hyperaldosteronismus, ist über die Funktion des nativen KCNJ5-Kanals in der Nebenniere wenig bekannt. KCNJ5 wird beim Menschen in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde exprimiert, aber auch in Herz, Nervensystem und anderen endokrinen Organen [108, 222–224]. KCNJ5/KCNJ3-Heterotetramere bilden im Herzen einen $G_{\beta\gamma}$ -aktivierten, einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanal (GIRK), der nach Bindung von Acetylcholin an den M2-Rezeptor öffnet [222]. Zudem stimuliert der Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration in KCNJ5-überexprimierenden Kardiomyozyten der Ratte die KCNJ5-vermittelte Leitfähigkeit [225]. Ob KCNJ5 in der Nebenniere als Homotetramer oder Heterotetramer vorliegt, ist noch unklar. Eine loss-of-function-Mutation im KCNJ5-Gen wurde bereits 2010 in Verbindung mit dem Long QT Syndrom beschrieben [226]. Der adrenale Phänotyp der betroffenen Familie blieb allerdings ähnlich wie der der KCNJ5 knockout Maus unauffällig [227, 228]. Generell wird KCNJ5 in der Nebenniere der Maus nur sehr schwach exprimiert im Vergleich zur Expression im Herzen. In adrenalem Gewebe des Mensch (Nebenniere, Aldosteron-produzierendes Adenom, NCI-H295R-Zelllinie) ist KCNJ5 hingegen einer der am stärksten exprimierten Kaliumkanäle [108].

Neben der noch unklaren physiologischen Funktion des KCNJ5-Kanals bleiben auch offene Fragen bzgl. der molekularen Mechanismen (z.B. Regulation des gestörten intrazellulären Na^+ - und Ca^{2+} -Haushalts), die zu einer chronischen Aldosteronproduktion und Zellproliferation in KCNJ5-mutierten Zellen führen. Erste in-vitro-Experimente bestätigen Aldosteron-fördernde Prozesse in HAC15-Zellen mit KCNJ5-Mutation, sowohl auf Ca^{2+} - wie auch auf transkriptioneller Ebene [216, 219, 229].

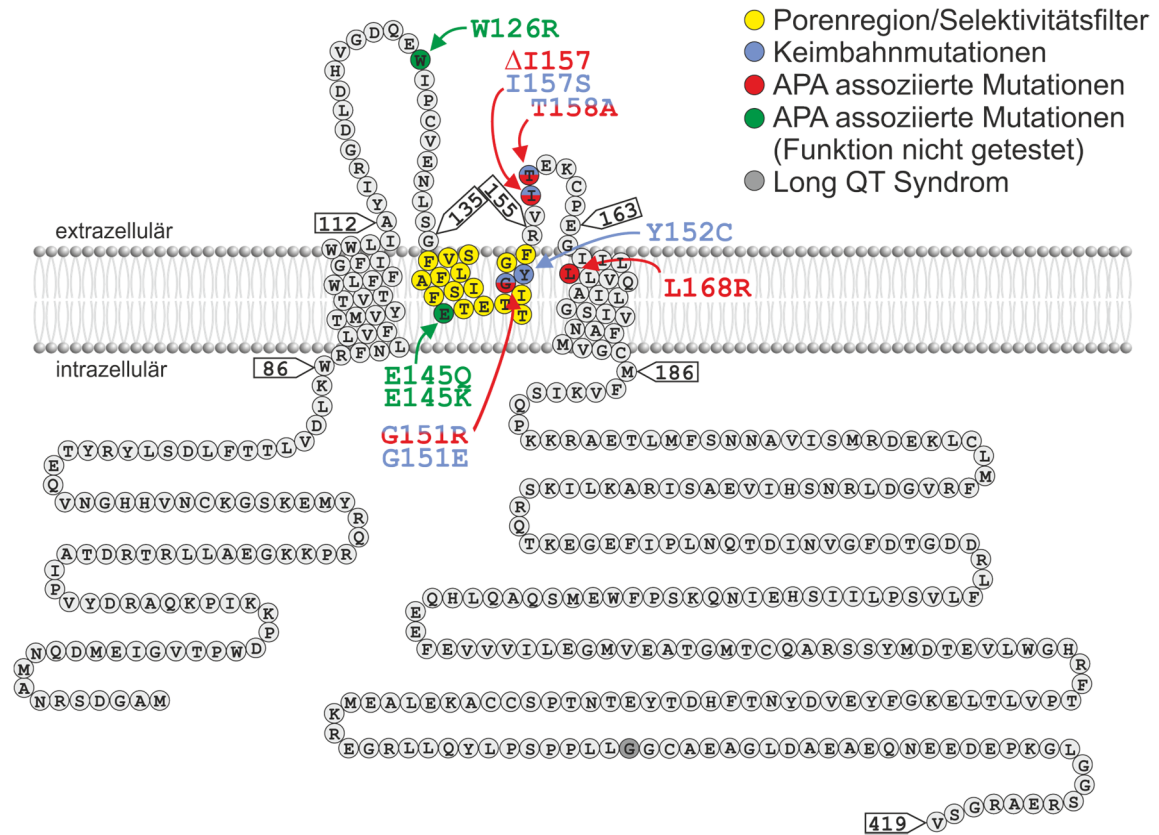


Abbildung 7: Schematische Darstellung des KCNJ5-Kanals mit bekannten Mutationen aus PA-Patienten

Die in Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus entdeckten KCNJ5-Mutationen sind alle direkt oder in der Nähe des Selektivitätsfilters des Kaliumkanals lokalisiert. Alle elektrophysiologisch charakterisierten KCNJ5-Mutationen bewirken einen Verlust der K⁺-Selektivität mit steigender Na⁺-Permeabilität. (Referenzen: siehe Text)

1.7 Zielsetzung

Die Funktion von Kaliumkanälen in der Zona glomerulosa der Nebenniere ist ausschlaggebend für die Regulation der Aldosteronproduktion. Klassische Studien an Mausmodellen belegen, dass die Kontrolle des Membranpotentials durch Kaliumkanäle wie Task1 und Task3 entscheidend für die intrazelluläre Ca^{2+} -Aktivität ist und dadurch die Aldosteronsekretion steuert. In Task3^{-/-} Mäusen konnte ein altersabhängiger Hyperaldosteronismus beobachtet werden, der besonders deutlich in neugeborenen Mäusen auftritt, wohingegen adulte knockout Mäuse ähnliche Aldosteronwerte wie Wildtypmäuse aufweisen. Beim Menschen scheinen hingegen Mutationen im Kaliumkanal KCNJ5 relevant für die Entstehung von primärem Hyperaldosteronismus zu sein. Trotz einschlägiger Befunde aus Exomsequenzierungs-Analysen von PA-Patienten in den letzten Jahren, bleiben noch vielen Fragen offen bzgl. der molekularen Mechanismen bei der Entstehung von Hyperaldosteronismus.

Ziel dieser Arbeit war daher, den adrenalen Phänotyp der Task3^{-/-} Maus während der postnatalen Entwicklung genauer zu charakterisieren und mögliche regulatorische Faktoren zu identifizieren, die eine Kompensation der autonomen Aldosteronproduktion in adulten Tieren erklären. Eine Genechip-Analyse, bei der das adrenale Expressionsprofil von 1 Tage alten mit 12 Tage alten Task3^{-/-} Mäusen verglichen wurde, sollte dabei erste Erkenntnisse liefern.

Des Weiteren war eine funktionelle Charakterisierung der APA-assoziierten KCNJ5-Mutationen G151E und L168R Gegenstand dieser Arbeit. Dabei wurden insbesondere Störungen der Ca^{2+} -Homöostase in mutierten Zellen und die pharmakologischen Eigenschaften der L168R-Mutation näher beleuchtet. Aufgrund der klinischen Relevanz von KCNJ5-Mutationen bei der Entstehung von primärem Hyperaldosteronismus sollte diese Arbeit mögliche Inhibitoren des mutierten KCNJ5 identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1 Methoden zur Charakterisierung neugeborener Task3^{-/-} Mäuse

2.1.1 Task3^{-/-} Mausmodell

Die Task3^{-/-} Maus stammt aus dem Labor von Dr. F. Lesage (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Nice Sophia-Antipolis, Valbonne, Frankreich) und wurde generiert, wie bei Guyon *et al.* beschrieben [230]. Die verwendeten Tiere wurden 11 Generationen in den genetischen Hintergrund des C57/Bl/6J Mausstammes zurückgekreuzt. In allen Experimenten wurden genetisch unveränderte C57/Bl/6J Mäuse gleichen Alters als Kontrolltiere verwendet. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und wurden unter gleichen Bedingungen in offener Tierhaltung gehalten. Die experimentellen Protokolle wurden von den örtlichen Tierschutzbehörden genehmigt und nach dem Deutschen und Französischen Tierschutzgesetz und dem NIH *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* durchgeführt. Adulte Mäuse wurden mit 1,5-3 % Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) in einem 1:1 Gemisch aus Sauerstoff und Stickstoff anästhesiert; 1 und 12 Tage alte Mäuse mit einem Gemisch aus Ketamin (120 µg/g Körpergewicht; WDT, Garbsen, Deutschland) und Xylazin (8 µg/g Körpergewicht; Serumwerk, Bernburg, Deutschland).

2.1.2 Bestimmung der Plasma-Na⁺-Konzentration und des Hämatokrits

Adulten Mäusen wurde Blut unter Anästhesie über Punktion des retrobulbären Venenplexus abgenommen und in heparinisierten Kapillaren gesammelt. Blutproben von neugeborenen Mäusen wurden unter Narkose durch Punktion des rechten Atriums generiert (Letalversuch). Nach Zentrifugation in einer Hämatokritzentrifuge (5 min; 8000 rpm) wurde der Hämatokrit-Wert bestimmt, das Blutplasma separiert und bei -20 °C eingefroren. Die Na⁺-Konzentration im Plasma wurde mit dem Flammenphotometer PFP7 von Jenway (Stone, Großbritannien) bestimmt.

2.1.3 Steroidhormonmessungen

Zur Bestimmung der Plasmasteroidhormonkonzentration (Aldosteron, Corticosteron, Progesteron und Pregnenolon) wurden spezifische ELISA der Firma IBL (Hamburg, Deutschland) verwendet.

2.1.4 Nebennierenlysate zur Aldosteronbestimmung

Beide Nebennieren wurden der anästhesierten Maus entnommen und gemeinsam in einem Eppendorfcup mit 250 µl PBS (in [mM]: 1.8 KH_2PO_4 ; 10.3 Na_2HPO_4 ; 137 NaCl; pH 7.4) 10 % BSA (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland) homogenisiert. Zur Steroidhormonextraktion wurden 250 µl Ethylacetat (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland) zugegeben, gevortext und nach Phasentrennung die obere, organische Phase mit einer Pasteurpipette in einem Glasgefäß gesammelt. Die verbleibende wässrige Phase wurde zwei weitere Male mit Ethylacetat extrahiert und die organischen Phasen vereinigt. Nach Abdampfen der organischen Phase unter Stickstoffbegasung wurde der steroidhaltige Niederschlag im Nullstandard des Aldosteron ELISAs gelöst.

2.1.5 Immunfluoreszenzfärbung

Neugeborene Mäuse wurden unter Anästhesie über den linken Ventrikel des Herzens mit Hilfe einer dünnen Kanüle und einer Spritze zuerst mit 5 ml einer 0.9 % NaCl-Lösung mit 10 I.U./ml Heparin (Heparin-Natrium-25000, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) perfundiert und damit durch Entbluten getötet. Danach wurde durch Perfusion mit 10 ml Fixierlösung (3 % Paraformaldehyd, in [mM]: 90 NaCl, 15 K_2HPO_4 , 1 EGTA, 2 MgCl_2 , 100 Saccharose, pH 7.4) das Gewebe fixiert. Nebenniere und benachbarte Niere wurden entnommen, in einer Lösung mit 17 % Saccharose für 30 min inkubiert und unter Verwendung von Isomethylbutan (-30 °C) schrittweise bis -80 °C eingefroren. Nach Einbettung der Nebenniere in *Tissue Tek® Compound* Einbettmedium (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) wurden an einem Kryostat CM3050 (Leica, Wetzlar, Deutschland) 5 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf Polylysin Objektträgern (Kindler, Freiburg, Deutschland) aufgenommen. Vor der Behandlung mit primärem Antikörper wurden die Gewebeschnitte 5 min in einer Lösung mit 0,1 % SDS in PBS inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Das Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde in PBS mit 0,04 % TritonX-100 (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und 5 % Bovinem Serumalbumin (BSA) durchgeführt. Primärer und sekundärer Antikörper wurden in einer Blockierlösung mit 0,04 % TritonX-100 und 0,5 % BSA in PBS verdünnt. Primäre Antikörper wurden stets über Nacht bei 4 °C inkubiert, sekundäre Antikörper jeweils nur 60 min bei Raumtemperatur.

Verwendete Antikörper:

Bezeichnung	Art	Verdünnung	Hersteller
anti-ratCyp11b2, rabbit polyclonal IgG	Primär- Antikörper	1:100	Dr. Gomez-Sanchez, Medical Center, University of Mississippi, Jackson, USA
anti-mouse Prorenin, rat monoclonal IgG2A (clone # 434703)	Primär- Antikörper	1:50	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
anti-Dab2, rabbit polyclonal	Primär- Antikörper	1:250	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA
anti-Task3, rabbit polyclonal	Primär- Antikörper	1:250	Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Alexa Fluor® 488 donkey anti rabbit IgG	Sekundär- Antikörper	1: 400	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
TRITC donkey anti rat IgG (H+L)	Sekundär- Antikörper	1: 400	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
HOE33342 (Stockkonz.: 5×10^{-4} M)	Zellkernmarker	1: 400	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.1.6 Reninmessung in Plasmaproben und Gewebelysaten

Die Plasmaproben zur Bestimmung der Reninkonzentration in neugeborenen Mäusen wurden durch Punktion des rechten Atriums gewonnen und in heparinisierten Kapillaren (Hämatokrit-zentrifuge: 5 min; 8000 rpm) zentrifugiert. Gefrorene Nebennieren und Nieren wurden in Lyse-Puffer homogenisiert (5 % Glycerin; 10 mM EDTA pH 8; 0.1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid; 0.1 mM 4-(2-Aminoethyl)-Benzensulfonylfluorid) und danach für 5 min bei 13 000 rpm (4 °C) zentrifugiert, um einen klaren Überstand für die Reninbestimmung zu erhalten. Bei der Reninmessung wird die Produktion von Angiotensin I aus Angiotensinogen bestimmt, weshalb die Plasma- und Gewebeproben für 1.5 h bei 37 °C mit Plasma von bilateral nephrektomierten männlichen Ratten (erhöhte Angiotensinogenkonzentration) inkubiert wurden. Danach wurde die AngiotensinI-Konzentration (ng/ml/h) als Maß für die Reninaktivität mithilfe eines ^{125}I -RIA bestimmt (Byk&DiaSorin Diagnostics GmbH, Dietzenbach, Deutschland). Die Reninmessungen aus Gewebelysaten wurden normalisiert auf die Proteinkonzentration des Lysats, gemessen mittels Bradford-Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland).

2.1.7 RNA-Isolation und quantitative Real-time PCR

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Nebennieren wurde nach Herstellerprotokoll mit dem RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt, der sich besonders eignet für die RNA-Aufreinigung aus kleinen Gewebeproben. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch quantifiziert (Nanodrop, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) und die Qualität mittels Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft. Für die Synthese einzelsträngiger cDNA mittels

reverser Transkription wurde 1 µg Gesamt-RNA, M-MLV Reverse Transkriptase (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) und random Primer (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) eingesetzt. Kontaminierung der RNA durch genomische DNA konnte durch die Mitführung von Reaktionsansätzen ohne Reverse Transkriptase (-RT) ausgeschlossen werden. Die quantitative Real-time PCR der cDNA wurde an einem LightCycler 480 Gerät (Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt unter Verwendung von intron-spanning Primern (Primersequenz liegt auf Exon-Exon-Grenze wenn möglich) und eines SYBR Green Mastermix (Roche). Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primersequenzen befindet sich im Anhang (Kapitel 7.1.1). Zur Quantifizierung wurde die Expression des Zielgens relativ zur Expression des Haushaltsgens β -Aktin unter Berücksichtigung der PCR-Reaktions-Effizienz (errechnet aus einer Verdünnungsreihe des Standards) berechnet. Mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und der Analyse der Schmelzkurven konnte die Spezifität des PCR-Amplikons verifiziert werden.

2.1.8 Genechip-Analyse des adrenalen RNA-Expressionsprofils

2.1.8.1 Microarray-Assay

Mit Hilfe eines Genechip-Microarray-Assay sollte das adrenale mRNA-Expressionsprofil von männlichen 1 und 12 Tage alten Task3^{-/-} Mäusen und Wildtypmäusen verglichen werden. Sämtliche Arbeiten von der RNA-Aufreinigung bis zur Probenverarbeitung wurden als Dienstleistung von dem Affymetrix Service Provider „KFB – Kompetenzzentrum Fluoreszente Bioanalytik“ (Regensburg, Deutschland) durchgeführt. Nach RNA-Extraktion aus Nebennierengewebe wurde die Unversehrtheit der RNA auf einem Agilent 2100 Bioanalyzer mit dem Eukaryote Total RNA Nano chip (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) überprüft. Die Aufbereitung der RNA-Proben für die Microarray-Hybridisierung erfolgte wie im Ambion WT Expression Kit Protokoll (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien) und dem Affymetrix Genechip WT Terminal Labeling and Hybridization Benutzerhandbuch (Affymetrix Inc., Santa Clara, Kalifornien) beschrieben. Der Vorgang soll im Folgenden kurz zusammengefasst werden:

300 ng Gesamt-RNA der Nebenniere werden in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Aus der doppelsträngigen cDNA wird antisense-RNA (aRNA) synthetisiert, aufgereinigt und mittels reverser Transkription sense strand cDNA (sscDNA) gebildet. Dabei werden dUTP-Nukleotide anstelle von dTTP-Nukleotiden in die sscDNA-Sequenz eingebaut. Nach Aufreinigung der einzelsträngigen sscDNA entfernen Uracil-DNA-Glykosylasen die Uracil-Reste aus der sscDNA, woraufhin die Apurinische/Apyrimidinische Endonuklease 1 die sscDNA an diesen Stellen fragmentiert. Zuletzt wird die fragmentierte sscDNA terminal biotinyliert und mit der Affymetrix Mouse Gene 1.1 ST Array Plate hybridisiert. Sämtliche Prozesse wie Hybridisierung,

Waschschritte, Färbung und Signalerfassung wurden mit dem Affymetrix GeneTitan System durchgeführt.

2.1.8.2 Microarray-Daten Analyse

Es wurden Microarray-Daten von vier Tieren pro Gruppe (1 Tage alte Task3^{-/-} Mäuse; 1 Tage alte Wildtypmäuse; 12 Tage alte Task3^{-/-} Mäuse; 12 Tage alte Wildtypmäuse) erhoben. Gemessene Signalstärken nach Hybridisierung der sscDNA wurden nach dem RMA Algorithmus [231] mit der Affymetrix GeneChip Expression Console Software verrechnet. In Microsoft Excel wurden die Rohdaten weiter ausgewertet und verrechnet (Mittelwertbildung der Expressionsstärke der einzelnen Gene; Vergleich von Expressionsverhältnissen einzelner Gene zwischen den Gruppen; Berechnung von Signifikanzen). Gene mit einem Expressionsunterschied ≥ 2 zwischen zwei Gruppen und einem p-Wert < 0.05 (Student's *t*-test) wurden als relevant reguliert bezeichnet (siehe Anhang: Kapitel 7.1.2). Eine Liste der am stärksten regulierten Gene (Expressionsunterschied ≥ 3) wird im Ergebnisteil der Arbeit aufgeführt (Kapitel 3.1.5). Genechip-Daten regulierter Gene, die möglicherweise Einfluss auf die Nebennierenfunktion haben, wurden mit quantitativer Real-time PCR in einer größeren Anzahl zusätzlicher Proben verifiziert.

2.1.9 Statistik

Die in den Abbildungen angegebene Anzahl an Experimenten bezieht sich auf die Anzahl der Tiere, die in den einzelnen Versuchen untersucht wurden, um den Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) bilden zu können. Mit Ausnahme der Daten der Genechip-Proben (ausschließlich männliche Tiere) stammen alle Daten von männlichen und weiblichen Mäusen. Da keine signifikanten geschlechtsabhängigen Unterschiede zu beobachten waren, wurden die Daten beider Geschlechter zur Mittelwertbildung zusammengefasst. Die Blutabnahme und Nebennierenentnahme bei neugeborenen Mäusen wurden als Letalexperiment durchgeführt, weshalb sich die Daten zu bestimmten Entwicklungsstadien (1 und 12 Tage alte Mäuse) auf einmalige Messungen einzelner Mäuse beziehen. Dementsprechend wurde der ungepaarte Student's *t*-test zur Berechnung von Signifikanzen verwendet. Unterschiede zwischen den Genotypen an einzelnen Zeitstufen wurden ab einem p-Wert < 0.05 als signifikant bezeichnet.

2.2 Methoden zur Charakterisierung von KCNJ5-Mutationen

2.2.1 Zellkultur und Transfektion

Zur funktionellen Expression von KCNJ3, KCNJ5 und mutiertem KCNJ5 (G151E, L168R, G151R, T158A) in Säugerzellen wurden spezifische humane cDNA-Sequenzen bei GeneArt®/Invitrogen bestellt und in den eukaryotischen Expressionsvektor pIRES-CD8 umklontiert [232]. Der pIRES-CD8 Vektor enthält zusätzlich das Gen für humanes CD8 (membranständiges Protein), das durch eine IRES-Kassette vom Zielgen getrennt ist. CD8 wird unabhängig vom Zielgen exprimiert und kann durch Verwendung von anti-CD8 gekoppelten Dynabeads zur Kontrolle der Transfektionseffizienz verwendet werden (Plasmidkarte siehe Anhang: Kapitel 7.1.3). Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und einer humiden Atmosphäre von 95 % Luft und 5 % CO₂ kultiviert. Für die entsprechenden Versuche wurden Zellen gesplittet, transfiziert und auf Fibronektin/Kollagen-beschichteten Glasplättchen in Zellkulturschälchen mit 3,5 cm Durchmesser ausgesät. Sämtliche Reagenzien und Zellkulturmedien stammen von Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland), wenn nicht anderweitig angegeben.

2.2.1.1 Transfektion von HEK-Zellen mit Lipofectamin

Für die funktionelle Untersuchung der von Mulatero *et al.* [210] beschriebenen KCNJ5 G151E-Mutation wurden HEK293-Zellen (CLS, Eppelheim, Deutschland) verwendet. Diese wurden in MEM alpha Medium unter Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum und 0.5 % einer Penicillin-Streptomycin-Stocklösung (10.000 U/ml) kultiviert. Einen Tag vor dem Experiment wurden HEK-Zellen mit pIRES/hKCNJ3 (0.5 µg Plasmid) und pIRES/hKCNJ5 WT bzw. pIRES/hKCNJ5 G151E (0.5 µg Plasmid) kotransfiziert. Die Transfektion mit Lipofectamin wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.2 Transfektion von NCI-H295R-Zellen mittels Elektroporation

Die aus einem Nebennierenkarzinom stammenden NCI-H295R-Zellen wurden bei Cell Lines Services (CLS, Eppelheim, Deutschland) erworben und in einem Zelllinien-spezifischen DMEM/F12 Medium (MG-42, CLS, Eppelheim, Deutschland) kultiviert. In den folgenden Kapiteln dieser Arbeit wird die Abkürzung NCI-Zellen gleichbedeutend für NCI-H295R-Zellen verwendet. NCI-Zellen (1x10⁶) wurden einen Tag vor Versuchsbeginn mit 5 µg pIRES/hKCNJ5 WT oder pIRES/hKCNJ5 L168R (bzw. G151R oder T158A) Plasmid unter Verwendung des NEON® Elektroporationssystems (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) transfiziert. Die Elektroporation mit einem auf NCI-Zellen optimierten Pulsprotokoll (1 Puls, 40 ms, 1100 V) wurde wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt und die Zellen in antibiotikafreiem MG-42 Medium ausgesät.

2.2.2 Patch clamp Experimente

Ganzzell-Messungen (Strom- und Potentialmessung über die gesamte Zellmembran) erfolgten bei Raumtemperatur an transfizierten HEK- und NCI-Zellen unter Verwendung eines EPC-10 Verstärkers (HEKA, Lambrecht, Deutschland). Zur Datenerfassung wurde das PowerLab Data Acquisition System (ADInstruments GmbH, Spechbach, Deutschland) mit der entsprechenden LabChartPro v7 Software benutzt. Die Pulsgenerierung konnte über die HEKA-Software PatchMaster v2x50 gesteuert werden. Das Klemmprotokoll bestand aus einer Spannungstreppe bei der die Zellmembran in 30 mV Schritten von -120 mV bis +30 mV geklemmt wurde (voltage clamp(vc)-Modus). Während im vc-Modus die spannungsabhängigen Zellströme gemessen wurden, konnte im darauffolgenden cc0-Modus (current clamp(cc)-Modus) das Membranpotential der Zelle bestimmt werden. Der Widerstand der verwendeten Patchpipetten betrug zwischen 6-10 MΩ. Die Pipettenlösung enthielt für Experimente an HEK Zellen [mM]: 5 HEPES, 140 KCl, 4 MgCl₂, 1 CaCl₂, 1 EGTA, pH 7.4; für Experimente an NCI-Zellen [mM]: 95 K-Gluconat, 30 KCl, 4.8 Na₂HPO₄, 1.2 NaH₂PO₄, 5 Glucose, 2.38 MgCl₂, 0.726 CaCl₂, 1 EGTA, 3 ATP, pH 7.2. In einigen Experimenten an NCI-Zellen wurden in der Pipettenlösung 30 mM KCl mit 30 mM NaCl ersetzt. Die extrazelluläre Badlösung setzte sich standardmäßig wie folgt zusammen [mM]: 140 NaCl, 1.8 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 10 HEPES, 5 KCl, pH 7.4. Bei Verwendung einer Na⁺-freien Badlösung ersetzte N-Methyl-D-glucamin (NMDG⁺) das Na⁺ in der Lösung. Hoch-K⁺-Lösungen (15 mM bzw. 50 mM KCl) enthielten entsprechend weniger NaCl (130 mM bzw. 95 mM NaCl).

2.2.3 Ca²⁺-Messung an transfizierten NCI-Zellen

Zur intrazellulären Ca²⁺-Messung wurde der ratiometrische Ca²⁺-sensitive Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Beladung der NCI-Zellen mit 0.5 μM Fura-2-AM in 1X Power Load (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland), gemeinsam gelöst in 1 ml Badlösung, fand bei Raumtemperatur für 45 min statt. Die extrazelluläre Badlösung setzte sich standardmäßig wie folgt zusammen [mM]: 140 NaCl, 1.8 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 10 HEPES, 5 KCl, pH 7.4. Bei Verwendung einer Na⁺-freien Badlösung ersetzte N-Methyl-D-glucamin (NMDG⁺) das Na⁺ in der Lösung; Hoch-K⁺-Lösungen (15 mM) enthielten entsprechend weniger NaCl (130 mM NaCl). Die Fluoreszenzemission einzelner Zellen wurde unter anhaltender Badperfusion bei 510 nm gemessen nach Anregung bei 340 und 380 nm. Als Lichtquelle diente ein Lambda DG-4 illumination system (Sutter Instrument Company, Novato, Kalifornien). Fluoreszenzmessungen (1 Bild pro 5 s) wurden an einem Zeiss Examiner A1 Mikroskop mit WN-Achroplan 40X Wasserimmersionsobjektiv (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) und gekoppelter Axiocam Mrm Kamera (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) aufgenommen. Das Verhältnis

der Fluoreszenzintensität bei 340 nm verglichen zu 380 nm wurde mit der Axiovision Software (Zeiss, Jena, Deutschland) berechnet und gilt als Maß der intrazellulären Ca^{2+} -Aktivität.

2.2.4 RNA-Isolation und quantitative Real-time PCR

Gesamt-RNA wurde aus NCI-Zellen, Aldosteron-produzierenden Adenomen und gesundem Nebennierengewebe gewonnen. Die RNA-Isolation, cDNA-Synthese und Real-time PCR wurde wie unter Kapitel 2.1.7 beschrieben durchgeführt. cDNA von weiteren humanen Gewebeproben wie Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas (human MTC panel I) wurden von Clontech Laboratories (Mountain View, Kalifornien, USA) erworben. Eine Auflistung der bei der Real-time PCR verwendeten Primer befindet sich im Anhang (Kapitel 7.1.1). Humane, adrenale Gewebeproben stammen von PA-Patienten der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV (Klinikum der Universität München, LMU) und wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. Felix Beuschlein pseudonymisiert zur Verfügung gestellt.

2.2.5 Substanzen zur pharmakologischen Charakterisierung von KCNJ5 L168R

Folgende Substanzen wurden zur pharmakologischen Charakterisierung der KCNJ5 L168R-Mutation verwendet: 5-(N-Ethyl-N-Isopropyl)Amilorid (EIPA), Flufenamat, Lidocain, Tertiapin Q, Triamteren, Amilorid, Benzamil, Phenamil, Bupivacain, Diltiazem, Nifedipin, Verapamil (alle Substanzen von Sigma-Aldrich, München, Deutschland); Cariporide (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland); KB-R7943 (Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien). Außer Tertiapin Q (gelöst in H_2O) wurden alle Substanzen als konzentrierte Stammlösung in DMSO gelöst. Zur Berechnung der Konzentrationswirkungskurven wurde die curve-fitting Software SigmaPlot verwendet.

2.2.6 Statistik

Die in den Abbildungen angegebene Anzahl an Experimenten bezieht sich auf die Anzahl der vermessenen Zellen, die zur Ermittlung des Mittelwerts und der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) herangezogen wurden. Zur Ermittlung von Signifikanzen wurde der gepaarte oder ungepaarte Student's *t*-test verwendet. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden ab einem *p*-Wert < 0.05 als signifikant bezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Adrenaler Phänotyp der neonatalen $\text{Task3}^{-/-}$ Maus

Die Deletion des Task3 -Gens führt in adulten Mäusen zur Erhöhung der Aldosteron-Renin-Ratio und zu einer salzempfindlichen Hypertonie, was auf eine Ang II-unabhängige Aldosteronsynthese hinweist. Dennoch wurden in adulten $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen unter Kontrollbedingungen weitgehend normale Plasmaaldosteronwerte gemessen, da ein kompensatorischer Abfall der Plasmarenin-konzentration die Ang II-kontrollierte Aldosteronproduktion entsprechend supprimiert [190]. Im Gegensatz dazu weisen neugeborene $\text{Task3}^{-/-}$ Mäuse einen ausgeprägten Hyperaldosteronismus auf, der sich innerhalb der ersten beiden Wochen der postnatalen Entwicklung normalisiert. Es liegt der Verdacht nahe, dass sich in der frühen postnatalen Phase kompensatorische Mechanismen entwickeln, die dem durch Task3 -Deletion ausgelösten Hyperaldosteronismus entgegenwirken. Im Folgenden werden daher die Ergebnisse der Untersuchungen zum adrenalen Phänotyp der $\text{Task3}^{-/-}$ Maus während der postnatalen Entwicklung dargestellt.

3.1.1 Lokalisation von Task3 und Cyp11b2 in Nebennieren neugeborener Mäuse

Bei $\text{Task1}^{-/-}$ Mäusen ging der Hyperaldosteronismus mit einer Fehllokalisierung der Aldosteronsynthese einher. Um zu überprüfen, ob der Phänotyp der neonatalen $\text{Task3}^{-/-}$ Mäuse mit ähnlichen Veränderungen vergesellschaftet ist, wurde die Cyp11b2 -Lokalisation in der Nebenniere neonataler $\text{Task3}^{-/-}$ Mäuse untersucht. Dazu wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Gefrierschnitten 1 Tage alter Wildtypmäuse und $\text{Task3}^{-/-}$ Mäuse angefertigt. Zusätzlich wurde die Expression von Task3 in Wildtypmäusen untersucht.

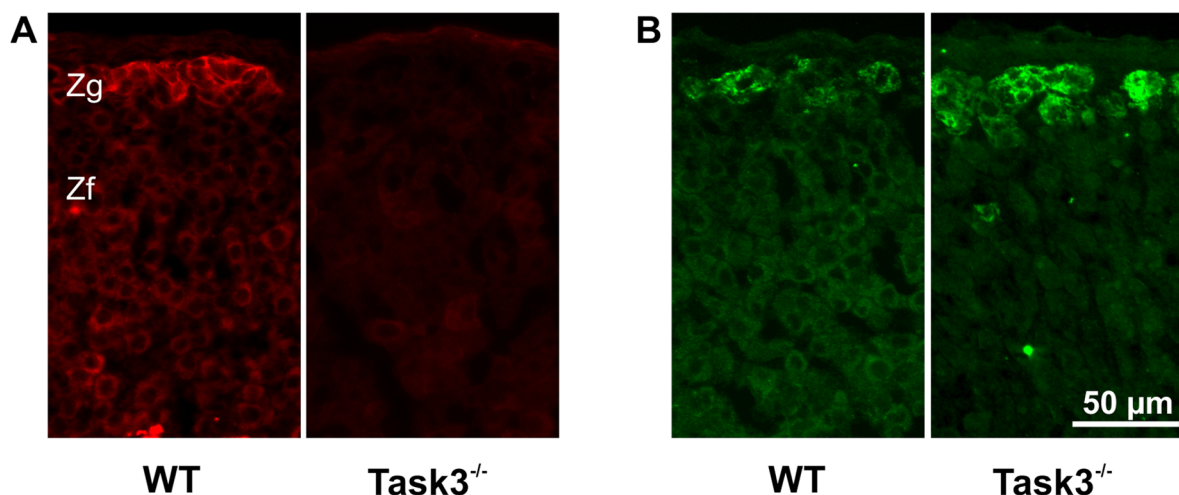


Abbildung 8: Task3(A)- und Cyp11b2(B)-Immunfluoreszenzfärbung von Nebennieren neugeborener Mäuse (1d)

Task3 war hauptsächlich in der Plasmamembran der Zona glomerulosa-Zellen der Nebennierenrinde exprimiert. Die Expression der Aldosteronsynthase Cyp11b2 in Task3^{-/-} Mäusen beschränkte sich ähnlich wie in Wildtypmäusen auf die Zellen der Zona glomerulosa.

Neugeborene Wildtypmäuse exprimierten Task3 hauptsächlich in der Plasmamembran der Aldosteron-produzierenden Zellen der Zona glomerulosa (Abb. 8A). Im Gegensatz zu männlichen, adulten Tieren konnte in neugeborenen Mäusen keine verbreiterte Task3-Expression in der Nebennierenrinde beobachtet werden. Die Expression der Aldosteronsynthase Cyp11b2 beschränkte sich in beiden Genotypen ebenfalls auf die äußeren Zellschichten der Nebennierenrinde (Abb. 8B).

3.1.2 Adrenales Steroidhormonprofil neugeborener Task3^{-/-} Mäuse

Neugeborene Task3^{-/-} Mäuse weisen einen Hyperaldosteronismus auf, der nicht auf eine Cyp11b2-Mislokalisierung zurückzuführen ist und sich innerhalb der ersten beiden Lebenswochen normalisiert. Zur vollständigen Charakterisierung des adrenalen Phänotyps der neonatalen Task3^{-/-} Maus wurden neben Aldosteron weitere adrenale Steroidhormone untersucht. Aufgrund des altersabhängigen Phänotyps wurden die Plasmakonzentrationen von Aldosteron, Corticosteron, Progesteron und Pregnenolon (Vorstufen von Aldosteron) in 1 Tage alten, 12 Tage alten und adulten Task3^{-/-} Mäusen miteinander verglichen.

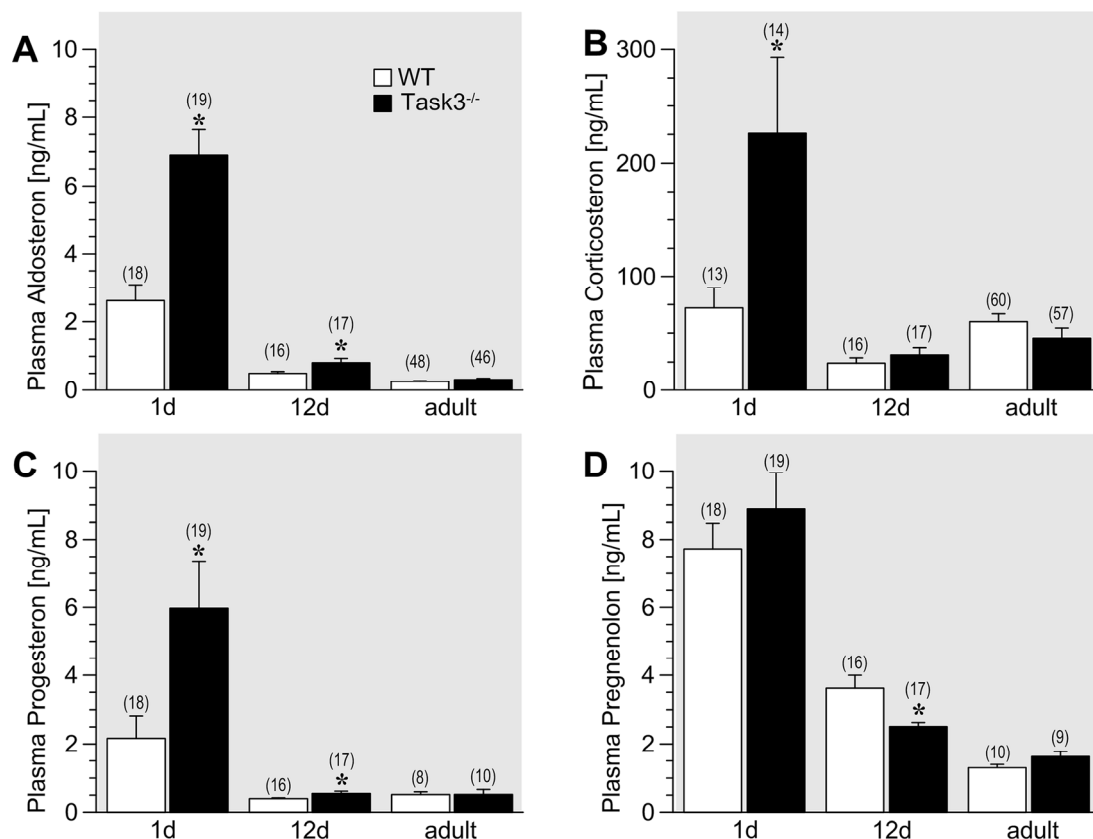


Abbildung 9: Plasmakonzentrationen verschiedener adrenaler Steroidhormone in 1 Tage alten (1d), 12 Tage alten (12d) und adulten Mäusen

Plasmakonzentration von Aldosteron (A) und Progesteron (C) waren in 1 Tage und 12 Tage alten $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen erhöht, während in adulten Tieren kein Unterschied zu erkennen war. Die Aldosteron-Daten sind bereits in Abb. 6 dargestellt und hier nur der besseren Vergleichbarkeit wegen nochmals gezeigt. $\text{Task3}^{-/-}$ Tiere zeigten einen Anstieg der Corticosteronwerte an Tag 1 mit bereits normalisiertem Corticosteronlevel an Tag 12 (B). Kein Anstieg der Pregnenolonkonzentration war in $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen zu beobachten (D). *bedeutet statistisch signifikant verschieden zwischen $\text{Task3}^{-/-}$ und Wildtyp; Die Zahl in Klammern (n) gibt die Anzahl der Tiere pro Gruppe an.

Im Vergleich zu Wildtypmäusen wurden in neugeborenen $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen (1d) neben Aldosteron deutlich erhöhte Plasmakonzentrationen an Corticosteron und Progesteron gemessen. Generell war während der postnatalen Entwicklung unabhängig vom Genotyp eine Abnahme von Aldosteron, Corticosteron und Progesteron im Plasma zu beobachten. Dieser rapide Abfall war in $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen besonders ausgeprägt und führte bereits in 12 Tage alten Tieren (12d) zu einem deutlichen Rückgang der Steroidhormonproduktion. In adulten Tieren war kein Genotyp-abhängiger Unterschied in den Plasmakonzentrationen von Aldosteron, Corticosteron und Progesteron mehr nachweisbar (Abb. 9, A-C). Ein ähnlicher altersabhängiger Rückgang war bei der Plasmapregnenolonkonzentration zu verzeichnen. In beiden Genotypen fiel das Pregnenolonlevel innerhalb der postnatalen Entwicklung ab, wobei $\text{Task3}^{-/-}$ Mäuse an Tag 12 geringere Pregnenolonwerte aufwiesen (Abb. 9D).

3.1.3 Adrenale mRNA-Expression steroidogener Enzyme in $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen

Vergleichend zu den erhöhten Steroidhormonkonzentrationen in 1 Tage und 12 Tage alten $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen wurde das Expressionslevel der entsprechenden Steroidhormon-produzierenden Enzyme in der Nebenniere von $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen während der postnatalen Entwicklung bestimmt. Dazu wurde die mRNA-Expression mittels Real-time PCR von Cyp11b2 (Aldosteronsynthese), Cyp11b1 (Corticosteronsynthese) und Hsd3b6 (Progesteronsynthese) quantifiziert.

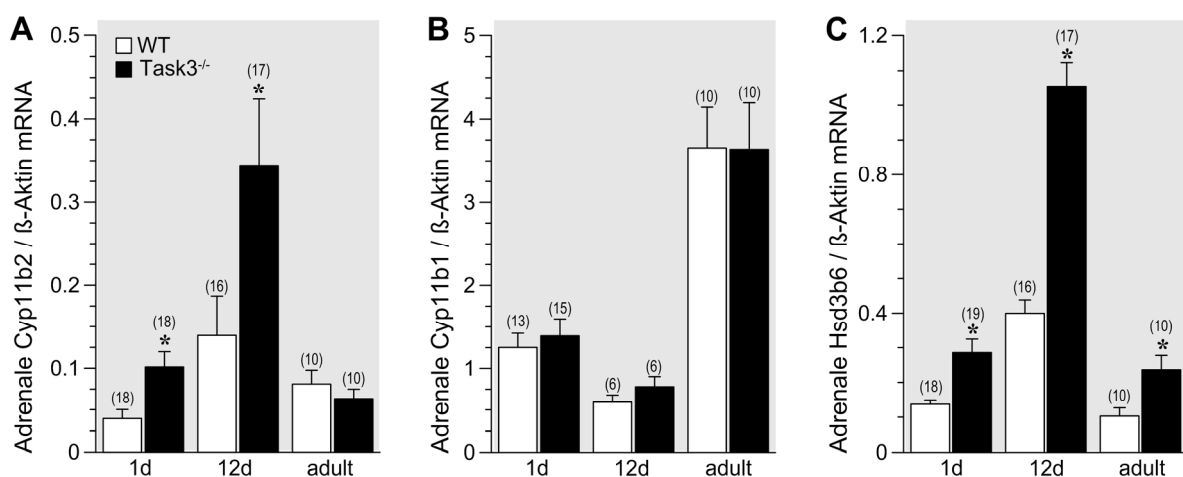


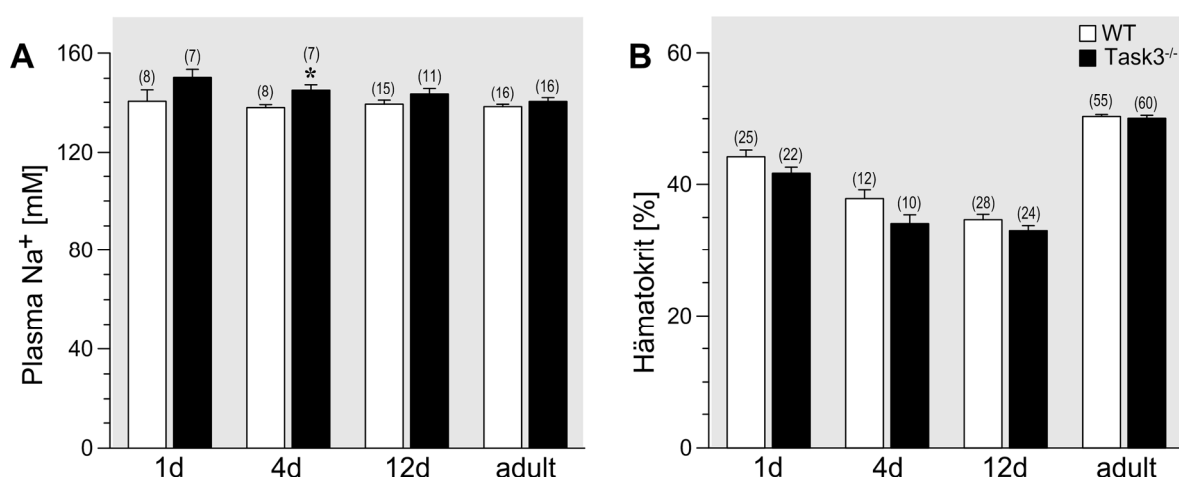
Abbildung 10: Adrenale mRNA-Expressionsstärke steroidogener Enzyme während der postnatalen Entwicklung

Die mRNA-Expressionslevel von Cyp11b2 (A), Cyp11b1 (B) und Hsd3b6 (C) wurden mittels Real-time PCR in 1 Tage alten, 12 Tage alten und adulten Wildtyp und Task3^{-/-} Mäusen gemessen. Cyp11b2 und Hsd3b6, die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der Aldosteron- bzw. Progesteron-Synthese, wiesen einen Expressionsanstieg in 1 und 12 Tage alten Task3^{-/-} Mäusen auf. Nur Hsd3b6 war auch in adulten Task3^{-/-} Tieren erhöht. Für das Corticosteron-produzierende Cyp11b1-Enzym konnten zu keiner Entwicklungsphase Genotyp-spezifische Expressionsunterschiede festgestellt werden. *bedeutet statistisch signifikant verschieden zwischen Task3^{-/-} und Wildtyp; Die Zahl in Klammern (n) gibt die Anzahl der Tiere pro Gruppe an.

Die Cyp11b2- und Hsd3b6-Expression waren in 1 Tage alten wie in 12 Tage alten Task3^{-/-} Mäusen deutlich erhöht (Abb. 10A, C). Während die Cyp11b2-Expression in adulten Tieren auf Wildtyp-niveau sank, blieb die Hsd3b6-Expressionsrate auch in adulten Task3^{-/-} Mäusen höher als in Wildtypmäusen. Für die Cyp11b1-Expression in der Nebenniere konnte kein altersabhängiger Unterschied zwischen den Genotypen beobachtet werden (Abb. 10B). Allgemein stieg die Cyp11b1-Expression in adulten Tieren im Vergleich zu jungen Tieren (1d, 12d) an, während Cyp11b2 und Hsd3b6 am stärksten in 12 Tage alten Mäusen exprimiert wurden.

3.1.4 Plasma-Na⁺-Level und Hämatokrit in neugeborenen Task3^{-/-} Mäusen

Der Hauptwirkungsort von Aldosteron zur Rückresorption von Salz und Wasser sind die kortikalen Abschnitte des Sammelrohrs der Niere. Aldosteron vermittelt dort die Aktivierung des apikal gelegenen Natriumkanals ENaC, was eine erhöhte Na⁺-Rückresorption und einen Anstieg des Plasmavolumens zur Folge hat. Vor diesem Hintergrund wurde in folgenden Experimenten die Na⁺-Konzentration im Plasma von neugeborenen Task3^{-/-} Mäusen mittels Flammenphotometrie vermessen. Zusätzlich wurde der Hämatokrit-Wert als Indikator des Wasserhaushalts bestimmt.

**Abbildung 11: Plasma-Na⁺-Konzentration und Hämatokrit während der postnatalen Entwicklung in Task3^{-/-} Mäusen**

In 1, 4, 12 Tage alten und adulten Wildtyp und Task3^{-/-} Mäusen wurden die Na⁺-Konzentration (A) mittels Flammenphotometrie und der Hämatokrit-Wert (B) gemessen. Task3^{-/-} Mäuse zeigten eine Hypernaträmie während der ersten beiden postnatalen Wochen. Gleichzeitig waren die Hämatokrit-Werte in neugeborenen Task3^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen leicht erniedrigt. *bedeutet statistisch signifikant verschieden zwischen Task3^{-/-} und Wildtyp; Die Zahl in Klammern (n) gibt die Anzahl der Tiere pro Gruppe an.

Innerhalb der ersten beiden Lebenswochen wiesen Task3^{-/-} Mäuse eine erhöhte Plasma-Na⁺-Konzentration auf, wobei nur an Tag 4 der Unterschied zwischen Wildtypmäusen und Task3^{-/-} Mäusen das Signifikanzniveau erreichte (Abb. 11A). Korrelierend dazu waren die Hämatokrit-Werte in Task3^{-/-} Mäusen während der postnatalen Entwicklung tendenziell erniedrigt (Abb. 11B), was für eine Zunahme des Plasmavolumens durch H₂O-Retention spricht. In adulten Tieren waren keine Unterschiede in Hämatokrit und Plasma-Na⁺-Konzentration zwischen den beiden Genotypen zu erkennen.

3.1.5 Microarray-Analyse: Adrenales Expressionsprofil 1 und 12 Tage alter Mäuse

Der adrenale Phänotyp der neonatalen Task3^{-/-} Maus beschränkt sich nicht nur auf die Aldosteronproduktion, sondern zeichnet sich durch eine generelle, inadäquat hohe Steroidhormonproduktion während der frühen postnatalen Entwicklung aus. Zur Identifizierung möglicher zellulärer Mechanismen, die den adrenalen Phänotyp der neonatalen Task3^{-/-} Maus mitbeeinflussen oder zu einer Kompensation in adulten Task3^{-/-} Tieren beitragen, wurde mittels Genechip-Analyse das adrenale mRNA-Expressionsmuster 1 und 12 Tage alter Task3^{-/-} Mäuse mit dem von Wildtypmäusen verglichen. Die folgende Tabelle zeigt die am stärksten regulierten Gene (≥ 3 fach reguliert) in 1 Tage alten und 12 Tage alten Mäusen (Vergleich: Task3^{-/-} Expression vs. WT Expression).

Adrenales mRNA-Expressionsprofil 1 Tage alter Mäuse:

Gen	Beschreibung	Verhältnis Task3 ^{-/-} vs. WT	p-Wert
Positiv reguliert:			
Ren1	renin 1 structural	9,6	1,1E-04
A2m	alpha-2-macroglobulin	6,3	1,7E-02
Ecel1	endothelin converting enzyme-like 1	5,8	5,0E-03
Lypd3	Ly6/Plaur domain containing 3	5,3	2,1E-02
Nefl	neurofilament, light polypeptide	4,2	7,2E-03
Gm10002	predicted gene 10002	3,9	1,1E-02
St6galnac5	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5	3,8	2,4E-03
Sv2c	synaptic vesicle glycoprotein 2c	3,6	2,0E-04
Slc16a3	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3	3,6	1,6E-02
Hcn1	hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K+ 1	3,2	4,2E-05
Sez6l	seizure related 6 homolog like	3,2	2,3E-04
Snca	synuclein, gamma	3,1	4,6E-02
Slc6a17	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 17	3,0	1,1E-04
negativ reguliert:			
Ctse	cathepsin E	-5,0	6,5E-03
Car1	carbonic anhydrase 1	-4,5	4,0E-02

Kel	Kell blood group	-4,0	4,6E-02
Cldn13	claudin 13	-4,0	1,7E-02
Rhag	Rhesus blood group-associated A glycoprotein	-3,7	1,6E-02
Rhd	Rh blood group, D antigen	-3,6	2,3E-02
Trpc5	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5	-3,5	2,3E-04
Hemgn	hemogen	-3,4	4,1E-02
Slc14a1	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1	-3,3	1,3E-02
Spna1	spectrin alpha 1	-3,2	2,1E-02
Gypa	glycophorin A	-3,2	3,8E-02
Tspo2	translocator protein 2	-3,1	1,7E-02
Htr1b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B	-3,1	3,5E-05

Adrenales mRNA-Expressionsprofil 12 Tage alter Mäuse:

Gen	Beschreibung	Verhältnis Task3 ^{-/-} vs. WT	p-Wert
Positiv reguliert:			
Lcn2	lipocalin 2	10,9	4,9E-02
Gm10002	predicted gene 10002	4,7	8,8E-04
Tac1	tachykinin 1	4,5	1,1E-04
Ctse	cathepsin E	4,5	3,7E-02
Tm4sf4	transmembrane 4 superfamily member 4	4,4	5,0E-03
Gal	galanin	4,3	7,4E-05
Hp	haptoglobin	3,4	3,8E-02
Calb1	calbindin 1	3,1	5,3E-03
Sv2c	synaptic vesicle glycoprotein 2c	3,0	3,8E-04
negativ reguliert:			
5730407I07Rik	RIKEN cDNA 5730407I07 gene	-4,8	3,8E-06
Htr1b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B	-3,1	4,5E-03

Tabelle 1: mRNA-Expression in Nebennieren neugeborener Wildtypmäuse und Task3^{-/-} Mäuse (1d, 12d)

Die zur Genechip-Analyse verwendeten mRNA-Proben stammen von 1 und 12 Tage alten Mäusen (n = 4 pro Alter und Genotyp). Genspezifische Expressionsverhältnisse wurden aus den Mittelwerten der einzelnen Gruppen errechnet. Gezeigt sind die Gene pro Altersstufe, die im Vergleich Task3^{-/-} vs. Wildtyp mehr als 3-fach positiv oder negativ reguliert waren und einen p-Wert < 0.05 aufwiesen. Eine komplette Liste der regulierten Gene befindet sich im Anhang (Kapitel 7.1.2).

Beim Vergleich der Expressionsverhältnisse zwischen 1 Tage alten Mäusen fiel unter allen regulierten Genen eine fast 10-fach vermehrte Expression der Protease Renin in den Nebennieren neugeborener Task3^{-/-} Tiere auf. Während Renin in 1 Tage alten Task3^{-/-} Mäusen das am stärksten positiv regulierte Gen war, entsprach das Expressionslevel in 12 Tage alten Task3^{-/-} Mäusen dem der Wildtypmäuse (siehe Kapitel 3.1.6 und 7.1.2).

3.1.6 Reninexpression in Nebennieren neugeborener Task3^{-/-} Mäuse

Die mittels Genechip-Analyse beobachteten Unterschiede in der adrenalen Renin-mRNA-Konzentration wurden mittels Real-time PCR in 1 Tage alten, 12 Tage alten und adulten Task3^{-/-} Mäusen und Wildtypmäusen überprüft. Zusätzlich wurde in Nebennierenlysaten die Reninkonzentration durch Messung der katalytischen Umsetzung von Angiotensinogen zu Angiotensin I bestimmt. Immunfluoreszenzfärbungen in Nebennieren neugeborener Task3^{-/-} Mäuse konnten zur Aufklärung der adrenalen Reninlokalisierung beitragen.

3.1.6.1 Renin-mRNA-Expression und Reninkonzentration in Nebennieren von Task3^{-/-} Mäusen

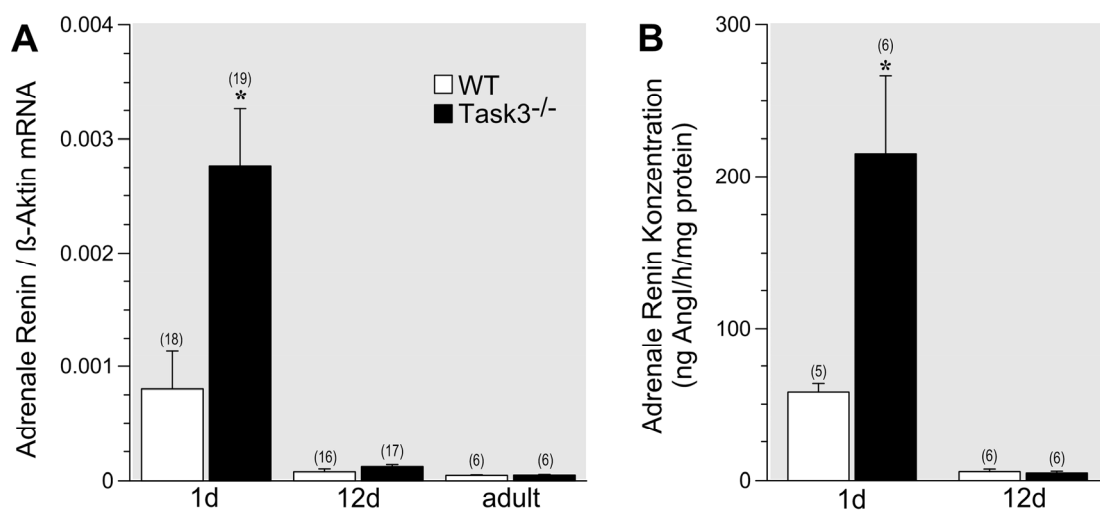


Abbildung 12: Renin-mRNA-Expression (A) und Reninkonzentration (B) in Nebennieren von Wildtypmäusen und Task3^{-/-} Mäusen

Die adrenale Renin-mRNA-Expression war in 1 Tage alten Task3^{-/-} Mäusen deutlich erhöht im Vergleich zu Wildtypmäusen, während in älteren Tieren (12d und adult) keine Unterschiede zwischen den Genotypen zu erkennen waren. Korrelierend dazu war auch in Nebennierenlysaten 1 Tage alter Task3^{-/-} Mäuse ein Anstieg der Reninkonzentration zu verzeichnen. *bedeutet statistisch signifikant verschieden zwischen Task3^{-/-} und Wildtyp; Die Zahl in Klammern (n) gibt die Anzahl der Tiere pro Gruppe an.

Die Quantifizierung der mRNA mittels Real-time PCR bestätigte eine höhere Expression von adrenalem Renin in 1 Tage alten Task3^{-/-} Mäusen (Abb. 12A). Die Renin-mRNA-Expression in der Nebenniere verringerte sich auf ein ähnliches Level in 12 Tage alten Tieren beider Genotypen und lag in adulten Tieren unterhalb des Detektionslimit. Ein ähnliches Profil zeigte die Reninkonzentration in Nebennierenlysaten. Während in Nebennierengewebe neugeborener Task3^{-/-} Mäuse eine erhöhte Reninkonzentration im Vergleich zu Wildtypmäusen gemessen wurde, sank die adrenale Reninkonzentration in 12 Tage alten Mäusen Genotyp-unabhängig deutlich ab.

3.1.6.2 Reninlokalisierung in Nebennieren neugeborener Wildtyp und Task3^{-/-} Mäuse

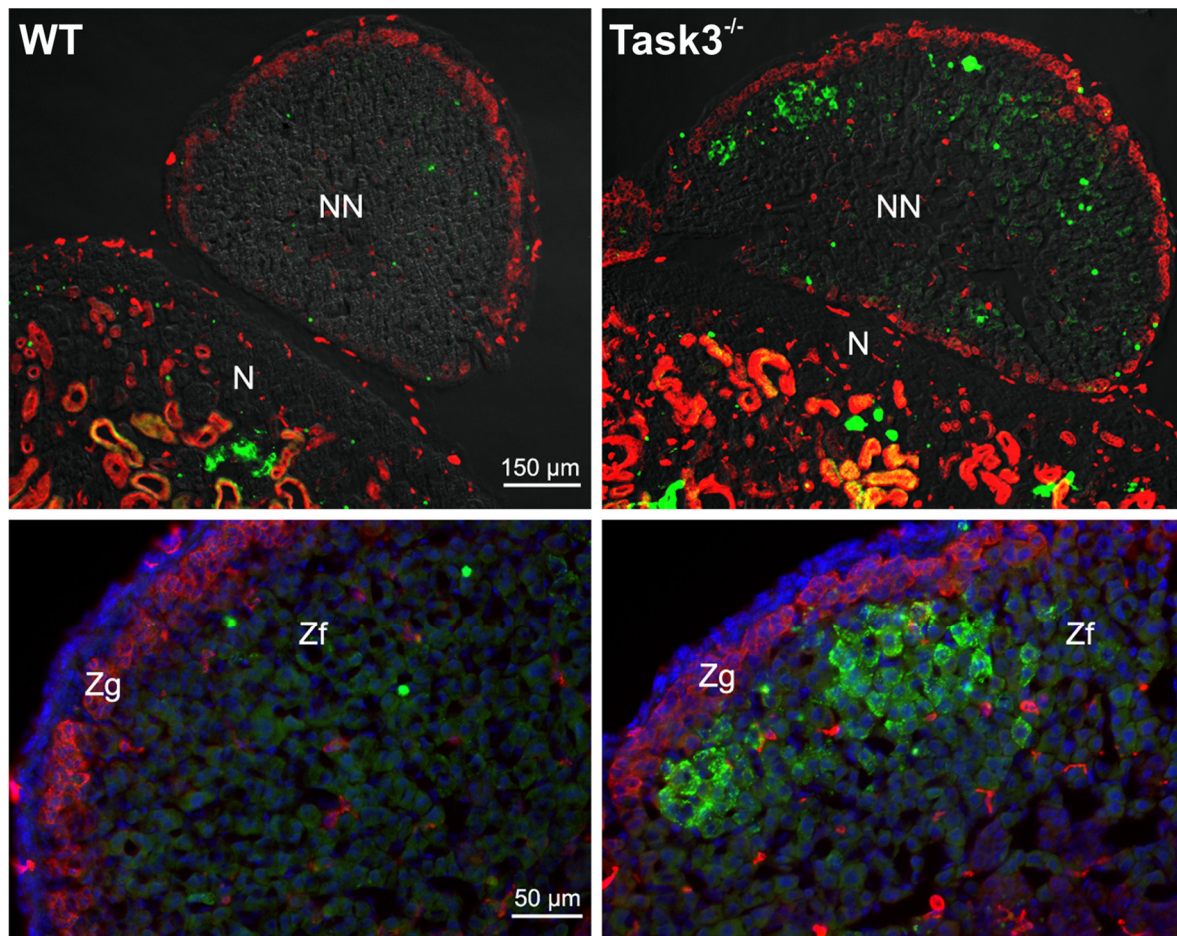


Abbildung 13: Nachweis von Renin in Nebennieren 1 Tage alter Task3^{-/-} Mäuse

Immunfluoreszenzfärbungen von Nebennieren 1 Tage alter Wildtyp und Task3^{-/-} Mäuse unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Renin (grün) und Dab2 (rot; Dab2 ist ein Marker für Zellen der Zona glomerulosa [233]). Zellkerne wurden mit HOE33342 angefärbt. Übersichtsaufnahmen zeigen die Nebenniere (NN) mit angrenzender Niere (N). Die beiden unteren Aufnahmen stellen dieselben Nebennieren in einer stärkeren Vergrößerung dar. Die adrenale Reninfärbung konnte nur in Zellen der Zona fasciculata von Task3^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden, während sich die Expression von Dab2 hauptsächlich auf die äußere Zellschicht der Zona glomerulosa beschränkte. (Zf, Zona fasciculata; Zg, Zona glomerulosa)

Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen auf Nebennierenschnitten 1 Tage alter Mäuse konnten Renin-produzierende Zellen eindeutig in der Nebennierenrinde neonataler Task3^{-/-} Mäuse lokalisiert werden (Renin-spezifische Färbung in grün). In Wildtyptieren blieb eine Renin-spezifische Färbung in der Nebenniere (NN) aus. Die in beiden Genotypen zu beobachtende charakteristische Reninfärbung im benachbarten Nierengewebe (N) bestätigte als interne Kontrolle die Spezifität des verwendeten Renin-Antikörpers. Kolo-kalisation von Dab2 (rot), einem typischen Marker der Zona glomerulosa, und Renin (grün) konnte in Nebennieren neugeborener Task3^{-/-} Mäuse nicht beobachtet werden, weshalb die Renin-produzierenden Zellen der Nebenniere 1 Tage alter Task3^{-/-} Mäuse eher der Zona fasciculata zugeordnet werden können.

3.1.7 Reninkonzentration in Plasma und Nierenlysaten von Task3^{-/-} Mäusen

Der nachgewiesene Anstieg des adrenalen Reninlevels in Task3^{-/-} Mäuse steht möglicherweise in engem Zusammenhang mit einer generellen Aktivierung der systemischen, renalen Reninproduktion. Zur Klärung dieser Frage wurde die Reninkonzentration im Plasma (PRC) und in Nierenlysaten von 1 Tage und 12 Tage alten Task3^{-/-} Mäusen mit der von Wildtypmäusen verglichen. Mithilfe der Plasmareninkonzentration konnte außerdem die Aldosteron-Renin-Ratio (ARR) bestimmt werden (Aldosteronwerte aus Kapitel 3.1.2). Eine erhöhte Aldosteron-Renin-Ratio gibt Hinweise auf autonome, Renin-unabhängige Aldosteronproduktion und wird zur klinischen Diagnose von primärem Hyperaldosteronismus verwendet.

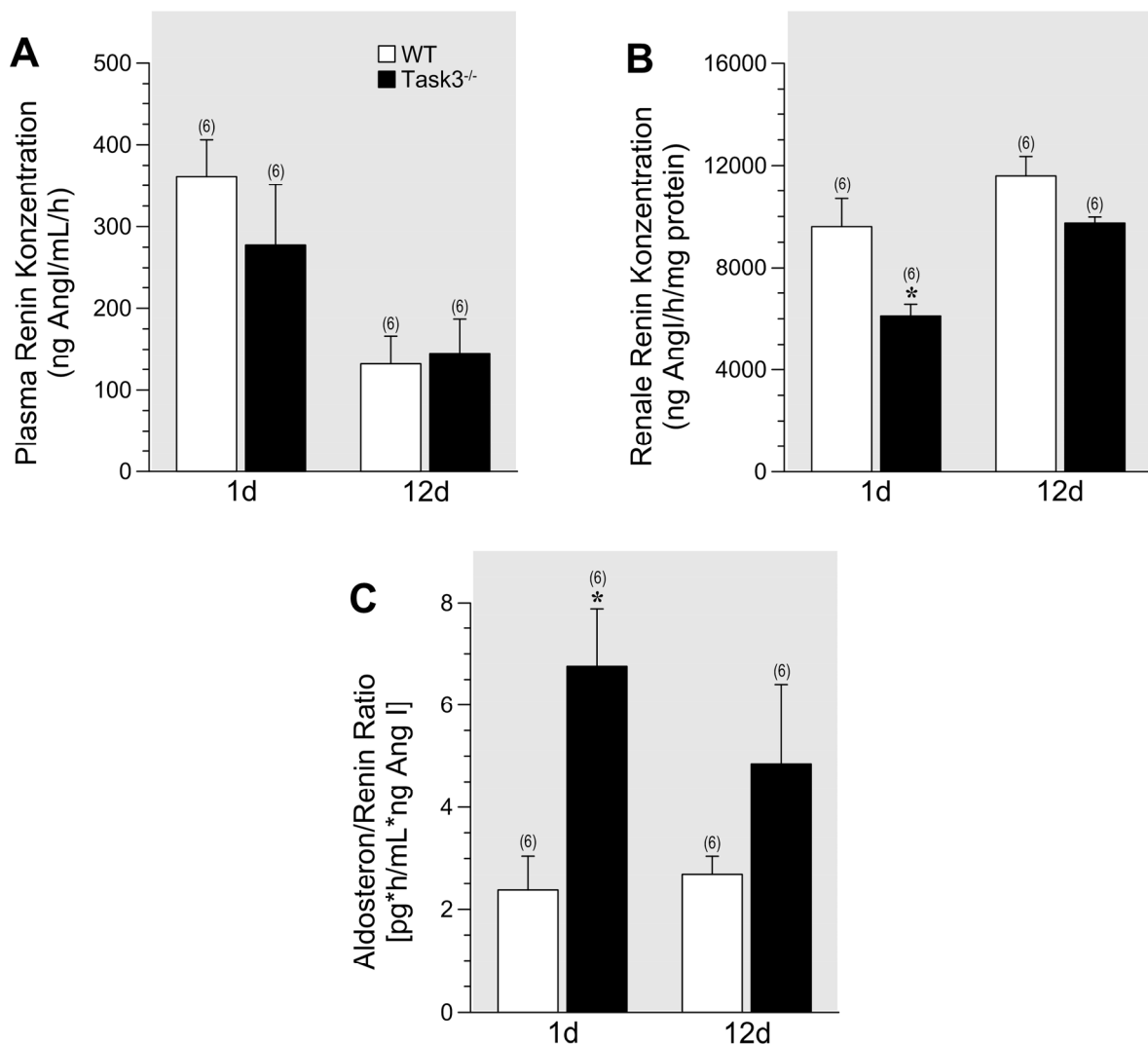


Abbildung 14: Plasma-, renale Reninkonzentration und Aldosteron-Renin-Ratio in Wildtyp und Task3^{-/-} Mäusen

Die Plasmareninkonzentration unterschied sich nicht zwischen den Genotypen (A). Neugeborene Task3^{-/-} Mäuse (1d) wiesen eine erniedrigte Reninkonzentration in Nierenlysaten (B) und eine deutlich erhöhte Aldosteron-Renin-Ratio (C) auf. *bedeutet statistisch signifikant verschieden zwischen Task3^{-/-} und Wildtyp; Die Zahl in Klammern (n) gibt die Anzahl der Tiere pro Gruppe an.

Bei Messungen der Plasmanreninkonzentration wurden keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt (Abb. 14A). Beim Vergleich der Plasmanreninkonzentration von 1 Tage alten und 12 Tage alten Tieren ließ sich ein genereller, altersabhängiger Abfall der Plasmanreninwerte während der postnatalen Entwicklung feststellen. Nierenlysate 1 Tage alter $\text{Task3}^{-/-}$ Mäuse wiesen sogar einen erniedrigten Reningehalt im Vergleich zu Wildtyptieren auf (Abb. 14B), möglicherweise als kompensatorische Feedback-Reaktion auf erhöhte Plasmaaldosteronwerte. In 12 Tage alten $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen glich die renale Reninproduktion den in Wildtypmäusen gemessenen Werten. Die Plasmanreninkonzentration war zwar in 1 Tage alten $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen gleichen Alters nicht signifikant verringert; dennoch ergaben sich aufgrund der viel höheren Plasmaaldosteronkonzentration für die Aldosteron-Renin-Ratio deutlich erhöhte Werte bei $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen, was den Verdacht einer autonomen Aldosteronsekretion in neugeborenen $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen verfestigt.

3.1.8 Adrenaler Phänotyp der $\text{Task3}^{-/-}$ Maus während der fötalen Entwicklung

Die Zonierung der Nebennierenrinde ist bei Mensch und Maus schon bei der Geburt größtenteils entwickelt, was eine zonenspezifische Steroidhormonproduktion ermöglicht. Während der späten fötalen Entwicklung (Tag 18-20 der Gravidität) steigt die Plasmaaldosteronkonzentration bei Mäusen stetig an und erreicht zur Geburt Maximalwerte [234]. Bereits wenige Stunden später ist die Aldosteronkonzentration im Plasma wieder deutlich gesunken. Untersuchungen der fötalen Aldosteronproduktion in $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen sollten die Frage klären, inwieweit der adrenale Phänotyp der neonatalen $\text{Task3}^{-/-}$ Maus in Verbindung zur Nebennierenentwicklung steht. Dazu wurde Aldosteron aus fötalen Nebennieren an Tag 17 und 19 der Gravidität (E17, E19) extrahiert und mit dem adrenalen Aldosterongehalt von neugeborenen $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen verglichen.

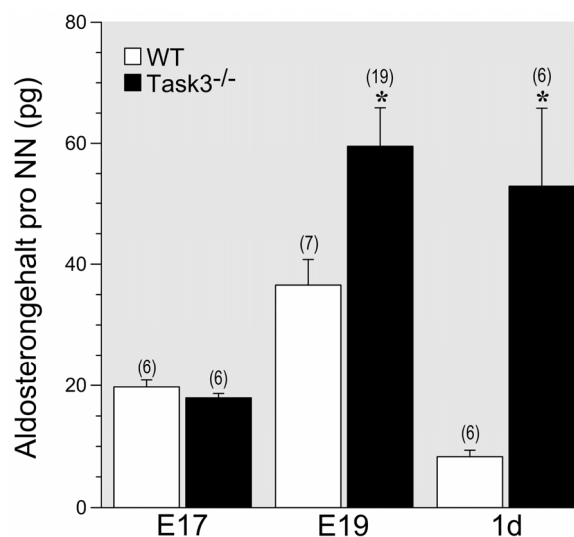


Abbildung 15: Aldosterongehalt in Nebennieren während der fötalen Entwicklung

Dargestellt ist der Aldosterongehalt in Nebennieren-Extrakten von Föten des 17. und 19. Tages der Gravidität (E17, E19) und neugeborener Task3^{-/-} Mäuse (1d). Die Aldosteronproduktion unterschied sich nicht in Wildtyp und Task3^{-/-} Föten an Tag 17 der Gravidität. 19 Tage alte Task3^{-/-} Föten entwickelten einen signifikanten Hyperaldosteronismus, der an Tag 1 nach Geburt noch auffälliger war. *bedeutet statistisch signifikant verschieden zwischen Task3^{-/-} und Wildtyp; Die Zahl in Klammern (n) gibt die Anzahl der Tiere pro Gruppe an.

In 17 Tage alten Föten glich der adrenale Aldosterongehalt von Task3^{-/-} Mäusen dem der Wildtyp-tiere, während zwei Tage später (E19) in Nebennieren von Task3^{-/-} Mäusen ein Anstieg der Aldosteronwerte zu verzeichnen war, weshalb von einer pränatalen Entwicklung des adrenalen Phänotyps auszugehen ist. Nichtsdestotrotz war der beobachtete Hyperaldosteronismus in neonatalen Task3^{-/-} Mäusen deutlich ausgeprägter als an E19. Im Gegensatz zu Task3^{-/-} Mäusen sank in Wildtyp-tieren das vor der Geburt (E19) angestiegene Aldosteronlevel postnatal ab.

3.1.9 Weitere Phänotyp-assoziierte, regulierte Gene in Task3^{-/-} Mäusen

Neben der auffälligen Reninexpression in den Nebennieren neugeborener Task3^{-/-} Mäuse fielen bei der Analyse der Genechip-Daten weitere regulierte Gene auf, deren Einfluss auf die Nebennierenfunktion bereits zuvor in der Literatur beschrieben war. Es liegt der Verdacht nahe, dass einige dieser Kandidaten möglicherweise an der Entstehung des adrenalen Phänotyps von Task3^{-/-} Mäusen beteiligt sind. Dementsprechend wurde die mRNA-Expression ausgewählter Kandidaten mittels Real-time PCR in Nebennierenproben von 1 Tage alten, 12 Tage alten und adulten Mäusen verglichen. Die folgende Tabelle listet die untersuchten Gene mit den entsprechenden Expressionsverhältnissen (Task3^{-/-} vs. Wildtyp) zu den einzelnen Entwicklungsstufen (1d, 12d, adult) auf.

Gen	Beschreibung	1d	12d	adult
Positiv reguliert:				
Tac1	Tachykinin 1	5.5 *	5.3 *	1.7
Gadd45b	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	4.2 *	0.5	1.1
Nr4a2	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	3.4 *	0.9	1.5
Gal	Galanin	2.9 *	9.0 *	1.0
Fst	Follistatin	2.8 *	2.7	0.8
Dkk3	Dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	2.5 *	2.7 *	1.9 *
Acvr1c	Activin A receptor, type IC	2.0 *	1.8 *	1.0
Sstr2	Somatostatin receptor 2	0.9	3.6 *	1.5
Negativ reguliert:				
Nnt	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase	0.4 *	0.5 *	0.4
Htr1b	5-Hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B	0.5 *	0.3 *	0.6
Trpc5	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5	0.5 *	0.6	0.2 *

Tabelle 2: Real-time PCR adrenaler cDNA 1 Tage alter, 12 Tage alter und adulter Wildtyp und Task3^{-/-} Mäuse

Die dargestellten Daten zeigen das Expressionsverhältnis (Task3^{-/-} vs. WT) einzelner Gene während der postnatalen Entwicklung. Zur Normalisierung der genspezifischen mRNA-Expression wurde das Haushaltsgen β -Aktin verwendet. Adrenale cDNA von n = 6-19 Tieren wurde zur Mittelwertberechnung der genspezifischen Expressionsrate verwendet. *bedeutet statistisch signifikant verschieden zwischen Task3^{-/-} und Wildtyp

Die Real-time PCR Ergebnisse bestätigten in neugeborenen Task3^{-/-} Mäusen eine erhöhte Expression spezifischer Gene, denen laut Literatur eine stimulierende Wirkung auf die Aldosteronproduktion zugeschrieben wird. Dazu zählen: Nr4a2 (Nurr1), ein Transkriptionsfaktor der die Cyp11b2-Expression positiv reguliert [167, 170]; Gadd45b, ein Ang II-induzierter Faktor der die Ang II-Zellantwort verstärkt (Phosphorylierung von MAP-Kinasen) [205, 235, 236]; die Neuropeptide Galanin [237–241] und Tachykinin1 [242–244], die die Corticosteron- und Aldosteronsekretion fördern; und der Acvr1c-Rezeptor, der durch Bindung von Aktivin A regulatorische Wirkung auf die Nebennierenentwicklung vermittelt [245, 246].

Im Gegensatz dazu scheinen folgende regulierte Faktoren der Aldosteronproduktion entgegenzuwirken und dienen möglicherweise zur Kompensation der Task3-Deletion in adulten Tieren: verminderte Expression von Nnt, das zur Bereitstellung von NADPH (Kofaktor aller CYP-Enzyme) benötigt wird [247, 248]; Rückgang des mRNA-Levels von Trpc5 (Ca²⁺-Kanal), der möglicherweise eine Rolle bei der Ang II-induzierten Calciumantwort spielt [249, 250]; erhöhte Expression des Somatostatin-Rezeptors Sstr2, der nach Somatostatin-Bindung inhibierend auf die Aldosteronsynthese wirkt [251, 252]; und der Expressionsanstieg von Dkk3, einem Faktor der in männlichen Task1^{-/-} Mäusen die Aldosteronsekretion reduzieren soll [253].

3.2 Funktionelle und pharmakologische Untersuchung APA-assoziierter KCNJ5-Mutationen

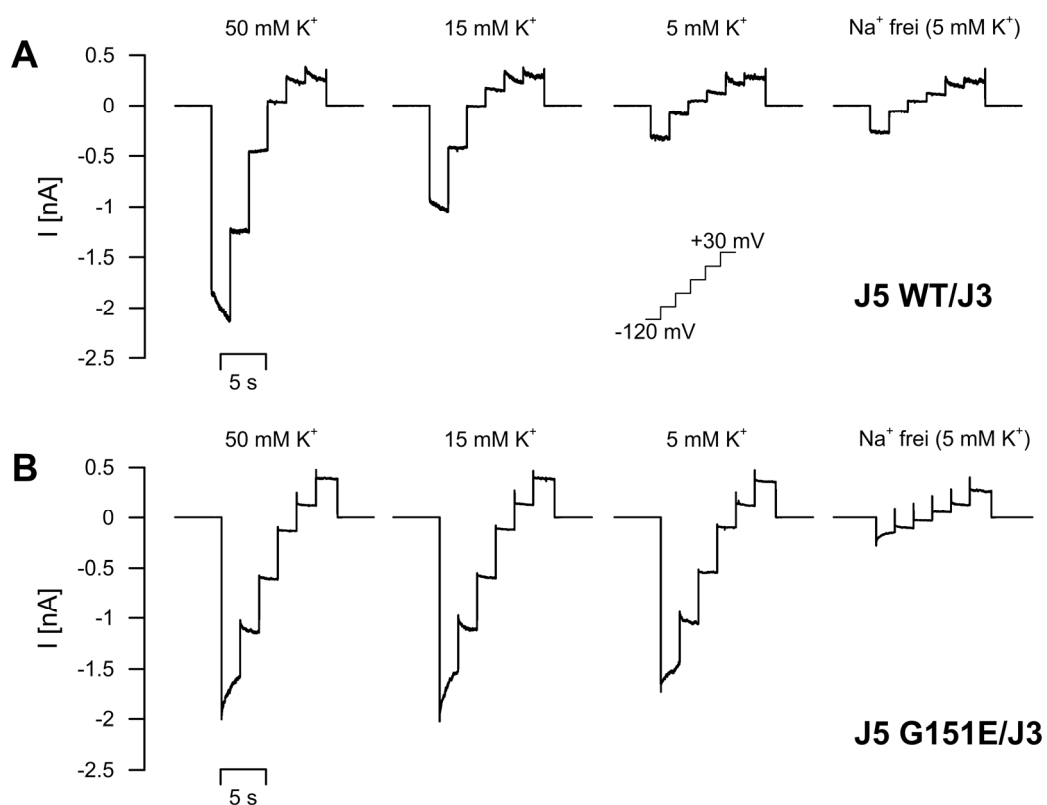
Bei 6-12 % der unter arteriellem Bluthochdruck leidenden Patienten wird ein primärer Hyperaldosteronismus als Krankheitsursache diagnostiziert, ausgelöst durch eine bilaterale Hyperplasie der Nebennierenrinde oder ein unilaterales Aldosteron-produzierendes Adenom [100]. Choi *et al.* konnten 2011 Mutationen im Selektivitätsfilter des Kaliumkanals KCNJ5 feststellen, die ursächlich für APA-Bildung wie auch für die Entstehung der familiär vererbaren Form von primärem Hyperaldosteronismus (FH Typ III) waren [108]. Weitere Studien konnten bis heute somatische KCNJ5-Mutationen in ca. 40 % aller Aldosteron-produzierenden Adenome nachweisen [254]. Charakteristisch für APA-assozierte KCNJ5-Mutationen ist der Verlust der Ionenselektivität, wodurch der mutierte Kanal auch für andere Kation wie Na⁺ und Ca²⁺ permeabel wird [108, 214]. Die daraus resultierende Depolarisation führt vermutlich zu einem Anstieg der

intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, was die unkontrollierte Aldosteronproduktion in Patienten mit einer adrenalen KCNJ5-Mutation erklären würde. Trotz zahlreicher klinischer Studien sind die zellulären Mechanismen, die zur Störung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts in KCNJ5-mutierten Zellen beitragen, weitgehend ungeklärt. Das folgende Kapitel beschreibt unsere Ergebnisse zur Untersuchung der Na^+ -Permeabilität und intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase in Zellen mit APA-assoziierten KCNJ5-Mutationen. Zusätzlich wird auf die pharmakologischen Eigenschaften des mutierten Kanals eingegangen.

3.2.1 Verlust der Ionenselektivität durch Mutationen in KCNJ5

3.2.1.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der KCNJ5 G151E-Mutation in HEK-Zellen

Die von Choi *et al.* beschriebenen KCNJ5-Mutationen (G151R, L168R, T158A) zeichnen sich durch einen Verlust der Ionenselektivität aus und machen den Kanal permeabel für Na^+ . Ähnliche Eigenschaften wies die in Kooperation mit Prof. Dr. Paolo Mulatero (Universität Turin, Italien) erstmals untersuchte G151E-Mutation auf [210]. Zur elektrophysiologischen Charakterisierung wurde die KCNJ5 G151E-Mutante bzw. KCNJ5 WT in HEK-Zellen überexprimiert. Zusätzlich wurde KCNJ3, der physiologische Partner von KCNJ5 im Herzen, kotransfiziert.



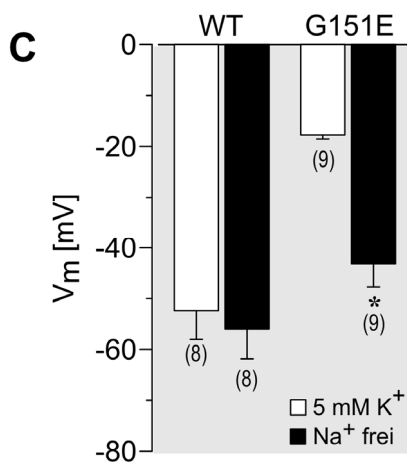


Abbildung 16: Funktionelle Charakterisierung der KCNJ5 G151E-Mutation in HEK-Zellen: Für elektrophysiologische Untersuchungen wurden HEK-Zellen mit KCNJ5 WT/KCNJ3 bzw. KCNJ5 G151E/KCNJ3 kotransfiziert. Dargestellt sind Strommessungen eines charakteristischen Patch-clamp-Experiments einer mit KCNJ5 WT (A) und KCNJ5 G151E (B) transfizierten Zelle. KCNJ5 WT erzeugte bei extrazellulär 50 mM K^+ einen stark einwärtsgerichtenden Strom, der mit sinkender K^+ -Konzentration im Bad abnahm. Die Wegnahme von Na^+ in der Badlösung hatte keine Auswirkungen. Die Reduktion der extrazellulären K^+ -Konzentration von 50 auf 5 mM bewirkte keine Änderung des durch KCNJ5 G151E erzeugten Ganzzellstroms. Unter Na^+ -freien Bedingungen war hingegen ein starker Rückgang des durch KCNJ5 G151E vermittelten Stroms zu beobachten. Messungen des Membranpotentials (C) in KCNJ5 G151E-überexprimierenden HEK-Zellen bestätigten eine von der extrazellulären Na^+ -Konzentration abhängige Depolarisation. *bedeutet statistisch signifikant verschieden; Die Zahl in Klammern (n) gibt die Anzahl der Zellen pro Gruppe an.

Die Messungen des Ganzzellstroms KCNJ5 WT/KCNJ3-überexprimierender Zellen zeigten einen einwärtsgerichtenden Strom unter Kontrollbedingungen (5 mM K^+). Die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration von 5 auf 50 mM verstärkte den Einwärtsstrom in die Zelle (Abb. 16A). Die Verwendung von NMDG⁺ anstelle von Na^+ in der Badlösung hatte keinen Einfluss auf den gemessenen Ganzzellstrom bzw. auf das Membranpotential der KCNJ5 WT/KCNJ3-exprimierenden HEK-Zellen (Abb. 16A, C). Im Vergleich zu KCNJ5 WT wiesen HEK-Zellen mit KCNJ5 G151E/KCNJ3 bereits unter Kontrollbedingungen (5 mM K^+) einen starken Einwärtsstrom bei gleichzeitig depolarisierter Zellmembran auf (Abb. 16B, C). Änderungen der Kaliumkonzentration in der Badlösung hatten keinen Einfluss auf die gemessenen Ganzzellströme. Der Rückgang des kompletten Einwärtsstroms unter Na^+ -freien Bedingungen verbunden mit einer Hyperpolarisation des Membranpotentials, bestätigten die Na^+ -Leitfähigkeit des mutierten KCNJ5-Kanals.

3.2.1.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der KCNJ5 L168R-Mutation in NCI-Zellen

Zur Grundcharakterisierung der KCNJ5 G151E-Mutation wurden HEK-Zellen (embryonale Nierenzellen) verwendeten, die aufgrund ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften und hohen Transfektionsrate ein etabliertes Zellsystem zur funktionellen Untersuchung von Plasmamembrankanälen darstellen. Um allerdings die Auswirkungen von KCNJ5-Mutationen in nativem Nebennierengewebe besser verstehen zu können, wurde für künftige Versuche die von einem Nebennierenrindenzellkarzinom abstammende Zelllinie NCI-H295R verwendet. Außerdem wurde für weitere Analysen zur Pathophysiologie die im Vergleich zur KCNJ5 G151E-Mutation (Kapitel 3.2.1.1) deutlich häufiger auftretende KCNJ5 L168R-Mutation ausgewählt. NCI-Zellen wurden dementsprechend mit KCNJ5 WT bzw. KCNJ5 L168R transfiziert und elektrophysiologisch untersucht.

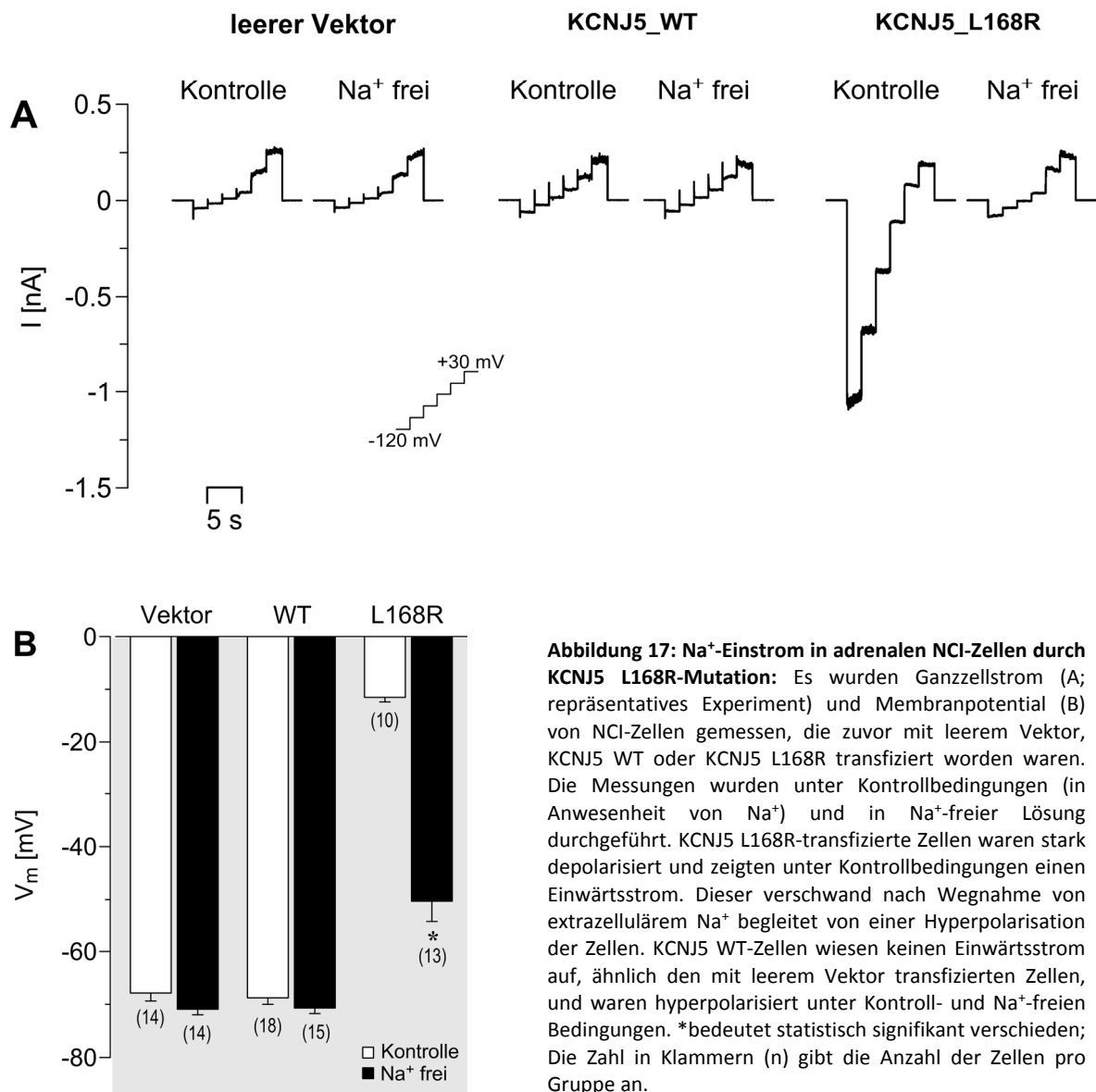


Abbildung 17: Na⁺-Einstrom in adrenalen NCI-Zellen durch KCNJ5 L168R-Mutation: Es wurden Ganzzellstrom (A; repräsentatives Experiment) und Membranpotential (B) von NCI-Zellen gemessen, die zuvor mit leerem Vektor, KCNJ5 WT oder KCNJ5 L168R transfiziert worden waren. Die Messungen wurden unter Kontrollbedingungen (in Anwesenheit von Na⁺) und in Na⁺-freier Lösung durchgeführt. KCNJ5 L168R-transfizierte Zellen waren stark depolarisiert und zeigten unter Kontrollbedingungen einen Einwärtsstrom. Dieser verschwand nach Wegnahme von extrazellulärem Na⁺ begleitet von einer Hyperpolarisation der Zellen. KCNJ5 WT-Zellen wiesen keinen Einwärtsstrom auf, ähnlich den mit leerem Vektor transfizierten Zellen, und waren hyperpolarisiert unter Kontroll- und Na⁺-freien Bedingungen. *bedeutet statistisch signifikant verschieden; Die Zahl in Klammern (n) gibt die Anzahl der Zellen pro Gruppe an.

Die in KCNJ5 WT-transfizierten NCI-Zellen beobachteten Ströme waren sehr klein und ähnelten den gemessenen Strömen von Zellen, die zuvor mit leerem Vektor transfiziert worden waren. Der Strom und das Membranpotential der stark hyperpolarisierten KCNJ5 WT-Zellen blieben unter Na⁺-freier Lösung unverändert. Die KCNJ5 L168R-Überexpression in NCI-Zellen resultierte in einem von der extrazellulären Na⁺-Konzentration abhängigen Einwärtsstrom und einer depolarisierten Zellmembran. Das Verschwinden des Na⁺-Einstroms unter Na⁺-freien Bedingungen wirkte hyperpolarisierend auf die Zellmembran KCNJ5 L168R-exprimierender NCI-Zellen.

3.2.2 Gesteigerte Ca^{2+} -Aktivität in NCI-Zellen mit KCNJ5-Mutation

3.2.2.1 Ca^{2+} -Import durch Natrium-Calcium-Austauscher NCX in NCI-Zellen mit KCNJ5-Mutation

Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Zellen der Zona glomerulosa ist das zentrale Signal zur Aldosteronproduktion. Klassische Stimulatoren der Aldosteronsynthese, wie Angiotensin II und Kalium, bewirken eine Depolarisation der adrenokortikalen Zellen, gefolgt von der Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (L-Typ und T-Typ) und dem daraus resultierenden Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Aufgrund der erhöhten Na^+ -Leitfähigkeit und der depolarisierten Zellmembran geht man davon aus, dass ähnliche Ca^{2+} -erhöhenden Mechanismen durch KCNJ5-Mutation in adrenalen Zellen aktiviert werden. Das folgende Kapitel beschäftigt sich daher mit den Effekten von KCNJ5-Mutationen (G151R, L168R, T158A) auf den intrazellulären Ca^{2+} -Haushalt. Dazu wurden Ca^{2+} -Messungen an KCNJ5 WT-, KCNJ5 G151R-, KCNJ5 L168R- oder KCNJ5 T158A-überexprimierenden NCI-Zellen durchgeführt.

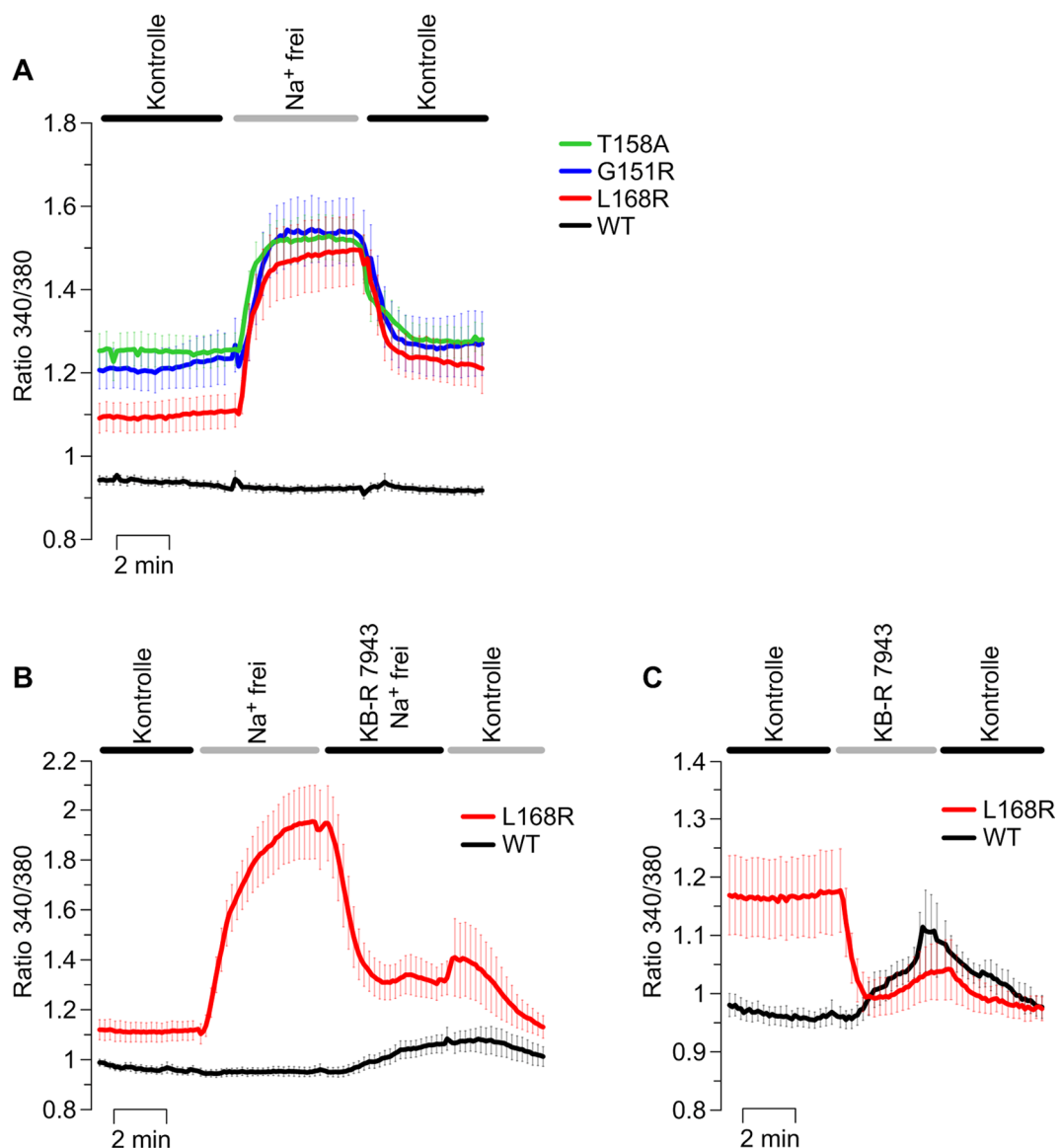


Abbildung 18: Ca^{2+} -Messungen (Fura-2-AM) in NCI-Zellen transfiziert mit KCNJ5 WT (schwarz) oder mutiertem KCNJ5 (blau: G151R, rot: L168R, grün: T158A): Dargestellt sind die Mittelwerte der Fura-2-Emissionsratio (\pm SEM) nach Anregung bei 340 und 380 nm ($n = 10\text{-}24$ Zellen pro Genotyp). Das basale Ca^{2+} -Level war in NCI-Zellen mit KCNJ5-Mutation erhöht im Vergleich zu KCNJ5 WT-exprimierenden Zellen (A). Unter Na^+ -freien Bedingungen stieg die Ca^{2+} -Konzentration in KCNJ5-mutierten Zellen weiter an. Die Zugabe von KB-R7943 ($10\text{ }\mu\text{M}$), einem Blocker des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers NCX, erniedrigte die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in Zellen mit KCNJ5-Mutation (L168R) unter Na^+ -freien (B) wie auch physiologischen Bedingungen (C). Auf KCNJ5 WT-exprimierende Zellen wirkte KB-R7943 Ca^{2+} -erhöhend.

Eine Erhöhung des basalen Ca^{2+} -Levels unter Kontrollbedingungen konnte in allen Zellen mit KCNJ5-Mutation (G151E, L168R, T158A) beobachtet werden. Die Wegnahme von Na^+ in der Badlösung verursachte einen starken Ca^{2+} -Anstieg im Cytosol mutierter Zellen, während KCNJ5 WT-transfizierte NCI-Zellen keine Ca^{2+} -Änderungen aufwiesen (Abb. 18A). Die beobachtete Erhöhung des Ca^{2+} -Signals unter Na^+ -freier Lösung in Zellen mit KCNJ5-Mutation ließ sich nicht durch klassische depolarisationsinduzierte Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle erklären, da die Plasmamembran KCNJ5-mutierter Zellen unter Na^+ -freier Lösung stark hyperpolarisiert war (Abb. 17B). Dementsprechend schienen andere Mechanismen ursächlich für den Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration zu sein.

Durch die pathologische Na^+ -Leitfähigkeit des mutierten KCNJ5 (Kapitel 3.2.1) reichert sich vermutlich Na^+ intrazellulär an, was den Verdacht einer Beteiligung des Natrium-Calcium-Austauschers NCX bei der Regulation des Ca^{2+} -Haushalts KCNJ5-mutierter Zellen verstärkte. NCX ermöglicht unter physiologischen Bedingungen den Austausch eines cytosolischen Ca^{2+} -Ions mit drei Na^+ -Ionen des Extrazellulärraums. Da es sich bei NCX um einen elektrogenen Transporter handelt, bestimmt neben dem Na^+ - und Ca^{2+} -Gradienten auch das Membranpotential der Zelle die Effektivität des NCX-Transports. Wir spekulierten, dass durch den Anstieg des intrazellulären Na^+ -Gehalts (Änderung des transmembranären Na^+ -Gradienten) und die Depolarisation der Plasmamembran die Transportrichtung des NCX umkehrt, wodurch Ca^{2+} in die Zelle importiert wird. Zur Klärung dieser Frage, wurde der Effekt von KB-R7943 (NCX-Blocker [255]) zuerst unter Na^+ -freier Badlösung in KCNJ5 L168R- und KCNJ5 WT-exprimierenden NCI-Zellen untersucht (Abb. 18B). Während in KCNJ5 WT-Zellen ein leichter Ca^{2+} -Anstieg zu verzeichnen war, sank das cytosolische Ca^{2+} -Level in NCI-Zellen mit KCNJ5 L168R rasch ab. Der Versuch wurde unter physiologischer Badlösung ($\text{Na}^+ = 140\text{ mM}$) wiederholt (Abb. 18C), wobei ähnliche Ergebnisse zu beobachten waren. KB-R7943 normalisierte die basal erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in KCNJ5 L168R-Zellen. Im Gegensatz dazu kam es in KCNJ5 WT-transfizierten Zellen zu einem Ca^{2+} -Anstieg, was mit der Inhibierung des NCX-gesteuerten Ca^{2+} -Exports zu erklären war.

3.2.2.2 Einfluss von spannungsaktivierten Ca^{2+} -Kanälen in NCI-Zellen mit KCNJ5-Mutation

Neben dem NCX-vermittelten Ca^{2+} -Importweg wurde auch der Beitrag der spannungsaktivierten Ca^{2+} -Kanäle zur Pathogenese des Hyperaldosteronismus durch KCNJ5-Mutationen untersucht. Dazu wurde das Ca^{2+} -Signal in transfizierten NCI-Zellen unter Zugabe von Verapamil (10 μM) gemessen, einem Inhibitor spannungsabhängiger L- und T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle [256].

NCI-Zellen, die den KCNJ5 WT-Kanal exprimierten, zeigten keine Reaktion auf Verapamil unter physiologischen Bedingungen. Eine Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration von 5 auf 15 mM erzeugte einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg, der durch Verapamil inhibiert werden konnte. KCNJ5 L168R-Zellen reagierten auf Verapamilgabe mit einer Abnahme der bereits unter Kontrollbedingungen erhöhten Ca^{2+} -Konzentration. Die Verapamil-Wirkung war reversibel, ein weiterer Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration unter Hoch- K^+ -Lösung blieb in Zellen mit KCNJ5 L168R-Mutation allerdings aus.

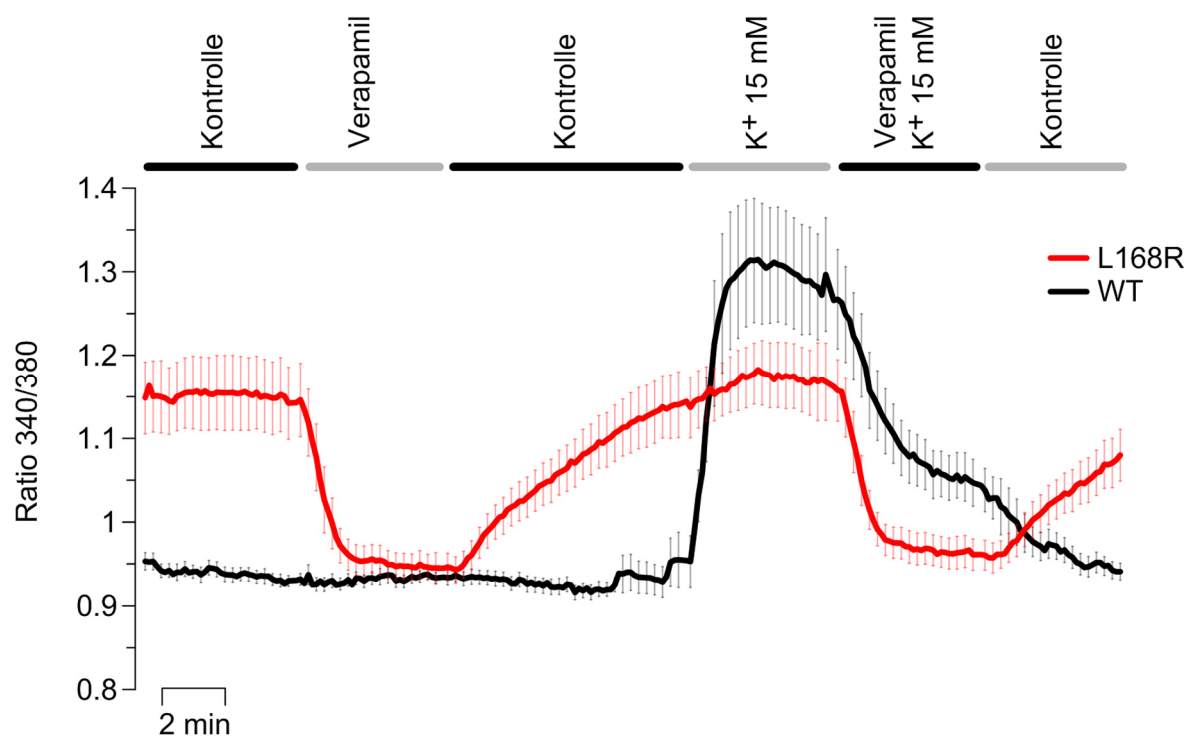


Abbildung 19: Effekt von Verapamil auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in KCNJ5 WT- und KCNJ5 L168R-transfizierten NCI-Zellen: Dargestellt sind die Mittelwerte der Fura-2-Emissionsratio (\pm SEM) nach Anregung bei 340 und 380 nm ($n = 13$ Zellen pro Genotyp). Verapamil (L- und T-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Inhibitor) normalisierte die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in Zellen mit KCNJ5 L168R-Mutation, zeigte aber keine Effekte auf das basale Ca^{2+} -Level in KCNJ5 WT-Zellen. Unter Hoch- K^+ -Lösung (15 statt 5 mM) stieg das intrazelluläre Ca^{2+} in KCNJ5 WT-Zellen an, in KCNJ5 L168R-transfizierten Zellen dagegen nicht. Verapamilzugabe wirkte dem Ca^{2+} -Anstieg unter K^+ 15 mM in KCNJ5 WT-Zellen entgegen.

3.2.3 Expression von NCX und NCKX in humanem Nebennierengewebe

Die beschriebenen Befunde stützten die Hypothese, dass der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers NCX durch Umkehr seiner Transportrichtung zur Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in Zellen mit KCNJ5 L168R-Mutation beiträgt. Um zu klären, welche der drei NCX-Isoformen bei der Entstehung des Phänotyps eine Rolle spielen könnten, wurde die mRNA-Expression von NCX1, NCX2 und NCX3 mittels Real-time PCR in humanen NCI-Zellen, Aldosteron-produzierenden Adenomen und gesundem Nebennierengewebe quantifiziert. Die adrenale Expression wurde mit dem NCX-Expressionslevel anderer humaner Gewebeproben verglichen. Bei der mRNA-Quantifizierung wurden außerdem die Mitglieder der NCX-verwandten Proteinfamilie der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -Austauscher (NCKX) berücksichtigt, da deren Inhibierung durch den NCX-Blocker KB-R7943 und somit eine Beteiligung am Ca^{2+} -Signal in KCNJ5 L168R-Zellen nicht ausgeschlossen werden kann. Im Gegensatz zu NCX tauscht NCKX 4 Na^+ gegen 1 Ca^{2+} + 1 K^+ , weshalb die NCKX-Transportrichtung nicht nur vom Na^+ -Gradienten, sondern auch vom transmembranären K^+ -Gradienten abhängig ist.



Abbildung 20: mRNA-Expression von NCX- und NCKX-Isoformen in NCI-Zellen und humanem Gewebe

Die mRNA-Expression wurde mittels Real-time PCR quantifiziert und auf die β -Aktin-Expression normalisiert. Für NCI-Zellen, Nebennierengewebe und Aldosteron-produzierendes Adenom wurden Mittelwerte aus $n=4$, $n=3$ und $n=3$ errechnet. Die cDNA der anderen untersuchten Gewebe ($n=1$) repräsentierte jeweils ein Gemisch aus Gewebeproben von 3-15 Spendern (kommerzielles cDNA Panel, Clontech). Expressionslevel der einzelnen Gene wurden im Verhältnis zur Expression im Gehirn in einer farblichen Skala dargestellt, wobei Rot dem Expressionsmaximum und Grün dem Expressionsminimum entspricht.

In Aldosteron-produzierenden Adenomen und gesundem Nebennierengewebe dominierte die Expression von NCX1 im Vergleich zu anderen NCX-Isoformen, wohingegen in NCI-Zellen NCX2 relevant exprimiert war. Alle Mitglieder der NCKX-Familie konnten in Nebennieren- und Adenomgewebe nachgewiesen werden, wobei eine besonders starke Expression von NCKX6 auffiel. Auch in NCI-Zellen war NCKX6 die am stärksten exprimierte Isoform. In anderen Geweben wies das Gehirn besonders hohe mRNA-Level aller NCX- und NCKX-Vertreter auf, mit Ausnahme von NCKX6. NCX3- und NCKX3-Expression dominierten im Skelettmuskel und NCX1 im Herzen.

3.2.4 Pharmakologische Eigenschaften von KCNJ5 L168R

Alle bekannten APA-assoziierten KCNJ5-Mutationen liegen in der Nähe oder direkt im Selektivitätsfilter des Kanals und machen den Kanal auch für andere Kationen wie Na^+ durchlässig. Änderungen der Aminosäurezusammensetzung nahe bzw. in der Porenregion des Kanals beeinflussen möglicherweise auch dessen pharmakologischen Eigenschaften. Dieser Frage sollte im folgenden Kapitel auf den Grund gegangen werden, wobei der Effekt klassischer KCNJ5-Blocker auf KCNJ5 L168R-transfizierte NCI-Zellen elektrophysiologisch untersucht wurde. Außerdem konnten einige Substanzen identifiziert werden, die hemmend auf den mutierten KCNJ5-Kanal (L168R) wirken und möglicherweise auch klinische Relevanz bei der Behandlung und Diagnose von primärem Hyperaldosteronismus haben.

3.2.4.1 Verlust der Tertiapin Q- und Bariumempfindlichkeit von KCNJ5 durch L168R-Mutation

Der in Kapitel 3.2.1.2 gemessene KCNJ5 WT-Strom in NCI-Zellen unterschied sich nicht vom Strom der mit leerem Vektor transfizierten Zellen, was eine Inaktivität des nativen KCNJ5-Kanals unter Ruhebedingungen vermuten lässt. Neben der G-Protein-Untereinheit $G_{\beta\gamma}$ bestimmt die intrazelluläre Na^+ -Konzentration die Aktivität von KCNJ5 [222, 225]. Nach Erhöhung der Na^+ -Konzentration in der Pipettenlösung war in NCI-Zellen, transfiziert mit KCNJ5 WT, unter Hoch- K^+ -Lösung (15 mM K^+) ein einwärtsgerichteter Strom messbar, der durch Tertiapin Q (KCNJ5-Blocker) gehemmt wurde. Im Gegensatz dazu wies der in KCNJ5 L168R-Zellen gemessene Einwärtsstrom keine Tertiapin Q-Empfindlichkeit auf (Abb. 21A). Des Weiteren konnte die von Choi *et al.* bereits in HEK-Zellen beschriebene, reduzierte Bariumsensitivität (Barium ist ein unspezifischer Kaliumkanal-Blocker) des KCNJ5 L168R-Kanals auch in NCI-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 21B) [108].

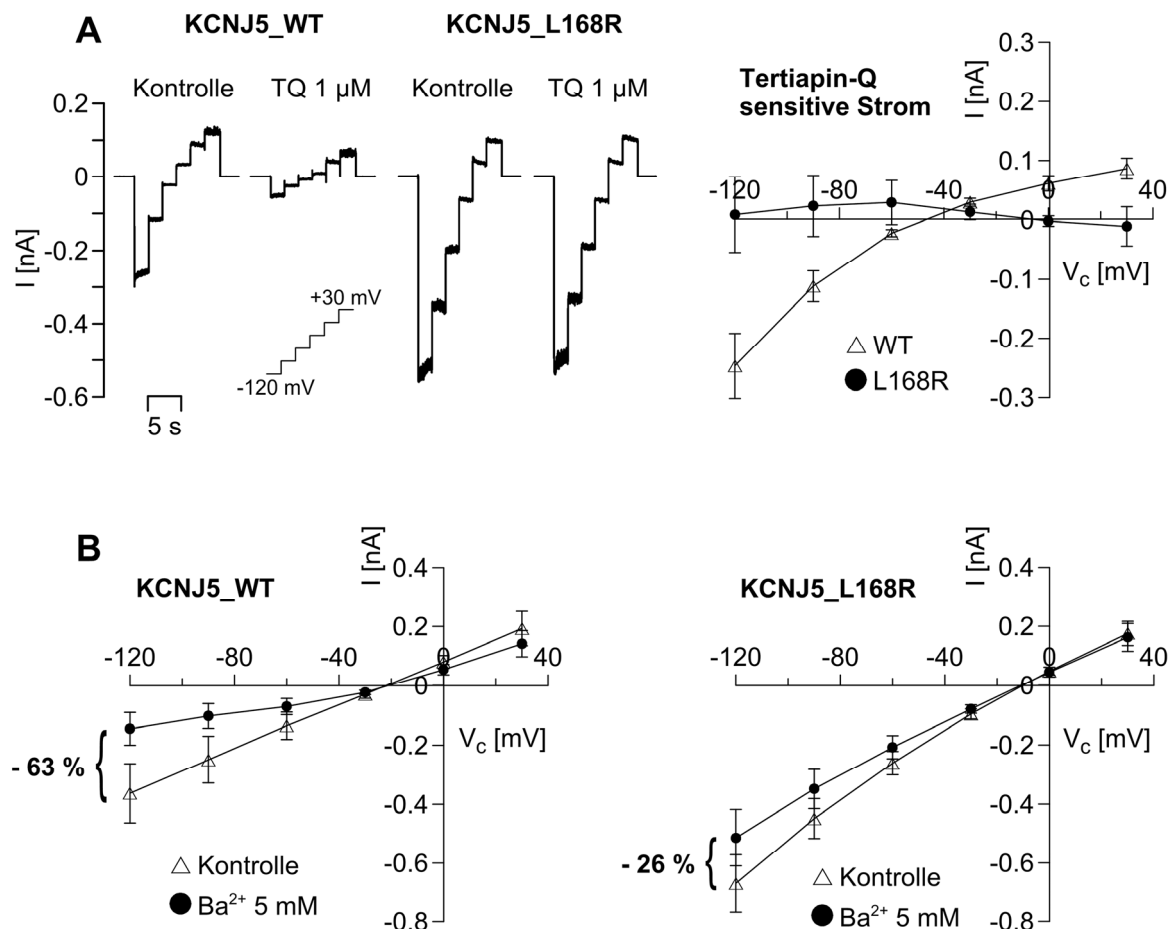


Abbildung 21: Tertiapin Q (A)- und Bariumeffekt (B) in NCI-Zellen transfiziert mit KCNJ5 WT bzw. KCNJ5 L168R

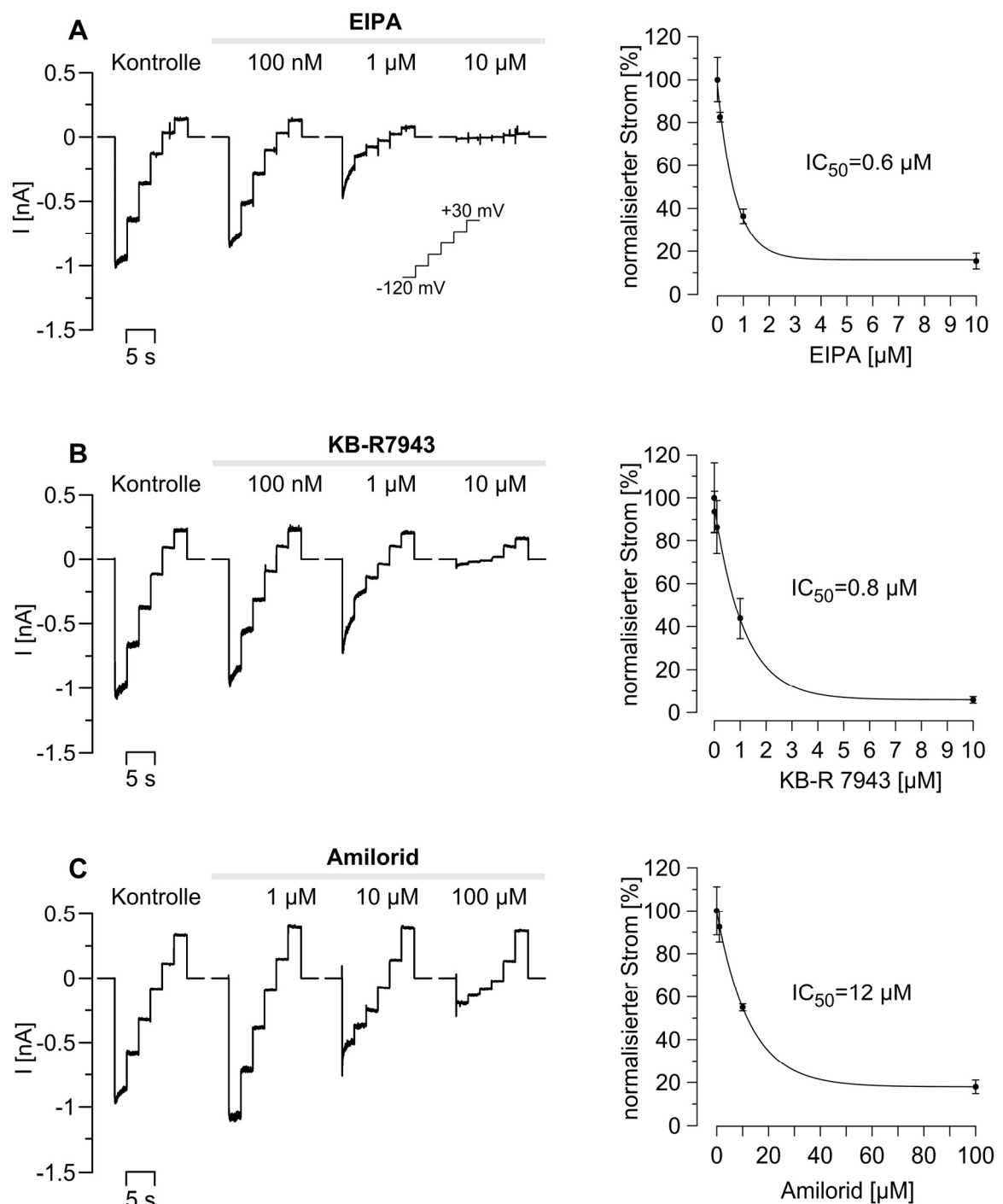
Diagramm A zeigt eine repräsentative Messung der Zellströme in KCNJ5 WT- und KCNJ5 L168R-transfizierten NCI-Zellen vor und nach Zugabe von Tertiapin Q (1 μ M) und den Tertiapin Q-hemmenden Anteil des Ganzzellstroms dieser Zellen in Form eines U/I-Diagramms (WT: n=12; L168R: n=6). Zur Aktivierung von KCNJ5 WT wurde eine Pipettenlösung mit erhöhter Na^+ -Konzentration (30 mM) und eine Hoch- K^+ -Badlösung (15 mM K^+ ; Verstärkung der Einwärtsgleichrichtung) verwendet. Der beobachtete einwärtsgerichtete KCNJ5 WT-Strom verschwand unter Tertiapin Q, während Zellen mit KCNJ5 L168R keine Tertiapin Q-Sensitivität aufwiesen. Barium (5 mM) inhibierte den Ganzzellstrom bei einer Klemmspannung von -120 mV und einer Badlösung mit K^+ 50 mM um ca. 63 % (\pm 9,8 % SEM, n=6) in Zellen mit KCNJ5 WT, hingegen in Zellen mit KCNJ5 L168R nur um 26 % (\pm 2,9 % SEM, n=5).

3.2.4.2 Inhibierung von KCNJ5 L168R durch Blocker des Na^+ - und Ca^{2+} -Transports

Die L168R-Mutation in der KCNJ5-Porenregion bewirkte einen Verlust der Tertiapin Q- und Bariumsensitivität, typischen Blockern des KCNJ5 WT-Kanals. Im Gegensatz dazu entdeckten wir eine erhöhte Empfindlichkeit des Na^+ -durchlässigen KCNJ5 L168R-Kanals für verschiedene Inhibitoren des Na^+ - und Ca^{2+} -Transports. Die stärkste inhibitorische Wirkung vermittelte 5-N-Ethyl-N-Isopropyl-Amiloride (EIPA), ein Blocker der Na^+/H^+ -Austauscher (IC_{50} = 0,6 μ M; Abb. 22A) [257], und der NCX-Blocker KB-R7943 (IC_{50} = 0,8 μ M; Abb. 22B). Eine deutlich geringere Affinität zu KCNJ5 L168R besaß das Diuretikum Amilorid (ENaC-Inhibitor) mit einem IC_{50} -Wert von 12 μ M (Abb. 22C). Unter den getesteten Substanzen befanden sich auch einige Inhibitoren der spannungsaktivierten Ca^{2+} -Kanäle, die bereits als klinische Therapeutika zur Behandlung von

Bluthochdruck eingesetzt werden. Dabei wies Verapamil ($IC_{50} = 1.2 \mu M$; Abb. 22D) die stärkste Hemmung des KCNJ5 L168R-induzierten Na^+ -Einwärtsstroms auf, gefolgt von Diltiazem ($IC_{50} = 11 \mu M$; Abb. 22E) und Nifedipin ($IC_{50} = 53 \mu M$; Abb. 22F).

Der Effekt potentieller KCNJ5 L168R-Inhibitoren wird in folgender Abbildung anhand repräsentativer Strommessungen an transfizierten NCI-Zellen und spezifischer Konzentrationswirkungskurven verdeutlicht. Eine Tabelle mit weiteren getesteten Substanzen befindet sich im Anhang (Kapitel 7.1.4).



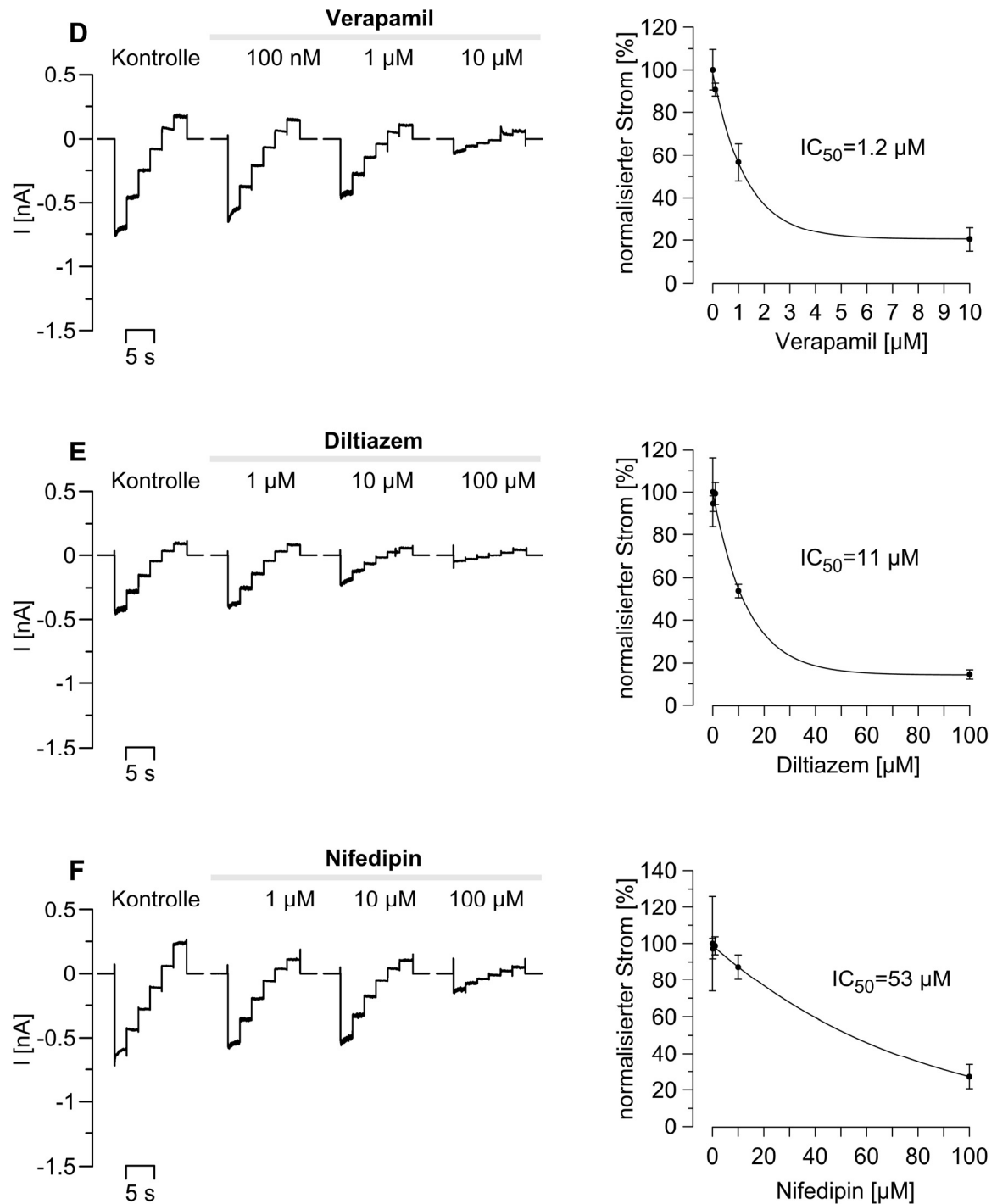


Abbildung 22: Pharmakologische Charakterisierung von KCNJ5 L168R in NCI-Zellen

An KCNJ5 L168R-transfizierten NCI-Zellen wurden die Effekte von verschiedenen Blockern des Na⁺- und Ca²⁺- Transports elektrophysiologisch untersucht. Dargestellt sind Ganzzellstrommessungen (repräsentative Experimente) unter Kontrollbedingungen und nach Zugabe unterschiedlicher Blockerkonzentrationen. Zur Erstellung substanzspezifischer Konzentrationswirkungskurven wurde der Einwärtsstrom bei -120 mV Klemmspannung nach Änderung der Blockerkonzentration gemessen. Es werden die Mittelwerte (n = 4-15) des verbleibenden Stroms nach Substanzgabe relativ zum gemessenen Strom unter Kontrollbedingungen (%) angegeben. Mit Hilfe der Konzentrationswirkungskurve konnte der IC₅₀-Wert bestimmt werden. Daten weiterer getesteter Inhibitoren sind im Anhang zu finden (Kapitel 7.1.4).

4. Diskussion

Das Mineralokortikoid Aldosteron, das in der Zona glomerulosa der Nebenniere produziert wird, ist bei Säugern der Hauptregulator des Wasser- und Elektrolythaushalts und somit auch des Blutdrucks. Ausschlaggebend für die Aktivierung der Aldosteronproduktion durch Angiotensin II oder Kalium ist dabei die Depolarisation der Zellen der Zona glomerulosa. Funktionelle Defekte in Kaliumkanälen, die zur Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials beitragen, können dementsprechend drastische Auswirkungen auf die Aldosteronproduktion haben und Krankheitsbilder wie primären Hyperaldosteronismus hervorrufen. Primärer Hyperaldosteronismus zeichnet sich aus durch eine autonome, unangepasste hohe Aldosteronproduktion unabhängig von systemischen Regulatoren. Studien an knockout Mausmodellen bestätigten die Beteiligung der Kaliumkanäle Task1 und Task3 an der Regulation der Aldosteronsekretion.

Diese Arbeit beschäftigte sich mit den Ursachen eines in neonatalen Task3^{-/-} Mäusen beobachteten primären Hyperaldosteronismus. Neben einer generellen Störung der adrenalen Hormonproduktion ist vermutlich auch adrenal produziertes Renin ursächlich für den altersabhängigen Hyperaldosteronismus in neugeborenen Task3^{-/-} Mäusen.

Ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit war zudem die Untersuchung von somatischen Mutationen des humanen KCNJ5-Kaliumkanals, die ursächlich für die Entstehung von bis zu 40 % von Aldosteron-produzierenden Adenomen sind. Die Charakterisierung der funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften APA-assoziiierter KCNJ5-Mutanten, die zur Entstehung von primärem Hyperaldosteronismus beitragen, lag dabei im Fokus.

4.1 Hyperaldosteronismus in neonatalen Task3^{-/-} Mäusen

4.1.1 Störung der adrenalen Steroidhormonproduktion in neugeborenen Task3^{-/-} Mäusen

Adulte Task3^{-/-} Mäuse weisen trotz gravierender Störungen auf zellulärer Ebene (Depolarisation des Ruhemembranpotentials und verstärkte Oszillationen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration) einen im Vergleich zu Task1^{-/-} und Task1^{-/-}/Task3^{-/-} Mäusen eher milden adrenalen Phänotyp mit nur leicht erhöhten Aldosteronwerten und salzempfindlicher Hypertonie auf [190, 191]. Interessanterweise fiel bei Untersuchungen zur Altersabhängigkeit des adrenalen Phänotyps von Task3^{-/-} Mäusen ein drastischer Anstieg der Plasmaaldosteronkonzentration in neugeborenen Task3^{-/-} Mäusen auf [207, 208]. Der Hyperaldosteronismus war in 1 Tage alten Task3^{-/-} Mäusen am ausgeprägtesten und normalisierte sich innerhalb der ersten beiden Lebenswochen auf Wildtypniveau. Die Höhe der Aldosteronproduktion wird neben anderen Faktoren durch die Expressions-

rate der Aldosteronsynthese Cyp11b2 reguliert. Korrelierend dazu konnte eine erhöhte Cyp11b2-Expression in den Nebennieren 1 und 12 Tage alter Task3^{-/-} Mäuse nachgewiesen werden (Abb. 9A). Immunfluoreszenzfärbungen bestätigten zudem die Expression der Cyp11b2 in den Zellen der Zona glomerulosa, wodurch eine Mislokalisierung der Cyp11b2 in der Zona fasciculata, wie sie in männlichen Task1^{-/-} Mäusen vor der Pubertät auftritt [187], als Ursache des altersabhängigen Hyperaldosteronismus ausgeschlossen werden konnte (Abb. 8B). Die Folgen einer erhöhten Aldosteronproduktion, wie die Anreicherung von Na⁺ im Plasma waren auch in neugeborenen Task3^{-/-} Mäusen zu beobachten (Abb. 11A). Die Hypernatriämie und der tendenziell verminderte Hämatokrit (Abb. 11B) sprechen für eine vermehrte renale Na⁺-Rückresorption und Volumenexpansion, die möglicherweise auch Auswirkungen auf den Blutdruck haben, welcher in neugeborenen Mäusen aus technischen Gründen allerdings nicht gemessen werden konnte.

Der Hyperaldosteronismus wurde von einer Überproduktion weiterer, adrenal gebildeter Steroidhormone begleitet. Neben Aldosteron waren auch erhöhte Corticosteron- und Progesteronwerte im Plasma neugeborener Task3^{-/-} Mäuse zu finden (Abb. 9B, C). Corticosteron wird in der Zona fasciculata von der 11 β -Hydroxylase (Cyp11b1) aus 11-Desoxycorticosteron gebildet, das auch der Aldosteronsynthese in der Zona glomerulosa als Substrat dient. Im Gegensatz zu Cyp11b2 waren überraschenderweise keine Unterschiede im adrenalen Cyp11b1-Expressionsniveau zwischen Wildtyp und Task3^{-/-} Mäusen zu erkennen (Abb. 10B), was die Frage nach dem Ursprung der erhöhten Corticosteronwerte in neugeborenen Task3^{-/-} Mäusen aufwarf. Da auch die Aldosteronsynthese 11 β -Hydroxylase-Aktivität besitzt, besteht die Möglichkeit, dass Corticosteron als Zwischenprodukt der Aldosteronsynthese freigesetzt wird. Untersuchungen zum katalytischen Mechanismus von Cyp11b2 belegen allerdings, dass die aktiven Zentren des Enzyms nicht zugänglich sind und somit die Zwischenprodukte der Aldosteronsynthese vermutlich am Cyp11b2-Enzym gebunden bleiben [93]. Möglicherweise begründet sich der Anstieg der Corticosteronwerte auch auf eine gestiegene Verfügbarkeit des Cyp11b1-Substrats 11-Desoxycorticosteron, das von Cyp21a1 aus Progesteron gebildet wird. Das Expressionslevel von Cyp21a1 war in Nebennieren neonataler Task3^{-/-} Mäuse nicht signifikant erhöht (WT: 2.5 \pm 0.7; Task3^{-/-}: 1.9 \pm 0.57). Allerdings wurden erhöhte Level an Hsd3b6-mRNA nachgewiesen (Abb. 10C). Hsd3b6 katalysiert die Umsetzung von Pregnenolon zu Progesteron, der Vorstufe von 11-Desoxycorticosteron, und wird ausschließlich in der Zona glomerulosa der Nebenniere exprimiert [258]. Vermehrte Progesteronproduktion in neonatalen Task3^{-/-} Mäusen fördert wahrscheinlich die Bildung von 11-Desoxycorticosteron, das dann in der Zona glomerulosa zu Aldosteron bzw. in der Zona fasciculata zu Corticosteron umgesetzt werden kann. Dass erhöhte Progesteronlevel zu einer überschießenden Aldosteronproduktion führen können, verdeutlicht die Arbeit von Doi *et al.* an Cryptochrom 1/2 (Cry 1, Cry 2) knockout Mäusen [258]. Die Deletion der Cry-Gene, die an der

Steuerung der circadianen Rhythmik beteiligt sind, führte zu einer Steigerung der Hsd3b6-Transkription in der Zona glomerulosa der Nebenniere und erhöhten Progesteronwerten, was in Verbindung mit primärem Hyperaldosteronismus an den adrenalen Phänotyp neugeborener Task3^{-/-} Mäuse erinnert.

4.1.2 Adrenale Entwicklungsstörungen ursächlich für Hyperaldosteronismus in neonatalen Task3^{-/-} Mäusen?

Die adrenale Steroidproduktion zeichnet sich in der Maus zwischen der späten fötalen und frühen postnatalen Phase durch eine starke Dynamik aus. So wurde in Wildtypmäusen zwischen dem 17. und 20. Tag der Gravidität eine transiente Erhöhung der Plasmaaldosteronkonzentration beschrieben [234]. Zum Zeitpunkt der Geburt erreichte das Aldosteronlevel Maximalwerte (weiterer Anstieg um bis zu 80 % im Vergleich zu Tag 20) und sank postnatal innerhalb der ersten beiden Lebensstage um 47 % ab. Somit könnte eine Verzögerung des physiologischen Aldosteron-Peaks, beispielsweise durch eine retardierte Nebennierenentwicklung, den Hyperaldosteronismus neonataler Task3^{-/-} Mäuse erklären. Messungen des Aldosterongehalts in fötalen Nebennieren (Abb. 15) bestätigten einen Anstieg der Aldosteronkonzentration an Tag 19 der Gravidität in Wildtypmäusen, gefolgt von einem Konzentrationsabfall an Tag 1 nach der Geburt. Im Vergleich dazu lag das Aldosteronlevel in Nebennieren von Task3^{-/-} Mäusen an Tag 19 deutlich über dem der Wildtyptiere und fiel auch nach der Geburt nicht ab. Folglich entwickelt sich der Hyperaldosteronismus in Task3^{-/-} Mäusen bereits im späten Fötalstadium. Dies spricht eher für eine Fehlregulation der Hormonsekretion als für eine isolierte Verzögerung der Nebennierenreifung in Task3^{-/-} Mäusen. Dafür spricht auch, dass keine signifikanten Unterschiede im Organgewicht der Nebennieren (WT: 0.33 ± 0.03 mg; Task3^{-/-}: 0.37 ± 0.06 mg) und der adrenalen Proteinmenge (WT: 25.6 ± 3.5 µg; Task3^{-/-}: 28.4 ± 3.9 µg) zwischen den beiden Genotypen detektierbar waren. Nichtsdestotrotz kann aufgrund des geringen prozentualen Anteils der Glomerulosazellen zur Gesamtzellmasse der Nebenniere eine Hyperplasie oder Hypertrophie der Aldosteron-produzierenden Zellen in neonatalen Task3^{-/-} Mäusen nicht vollständig ausgeschlossen werden.

4.1.3 Adrenale Reninexpression in neugeborenen Task3^{-/-} Mäusen

Ein Anstieg der Plasmanreninkonzentration und die daraus resultierende vermehrte Bildung von Angiotensin II ist, neben einem Anstieg der Plasma-K⁺-Konzentration, der wichtigste Stimulus der Aldosteronsynthese in der Nebenniere. Das ins Plasma freigesetzte Renin (systemisches Renin) stammt hauptsächlich aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere, allerdings wurden lokale

Renin-Angiotensin-Systeme in einer Vielzahl anderer Gewebe wie Gehirn, Gefäßendothel, Herz, Uterus, Hoden, Eierstöcke, Speicheldrüse, Hypophyse und der Nebenniere identifiziert [259]. Lokale Renin-Angiotensin-Systeme modulieren die Wirkung des systemischen Angiotensin II auf das Herz-Kreislauf-System, steuern aber häufig auch gewebsspezifische Funktionen. In Nebennieren adulter Ratten wird Renin in Zellen der Zona glomerulosa gebildet und steigt unter stimulierenden Bedingungen, wie Angiotensin II, K^+ oder Niedrig- Na^+ -Diät an [260, 261]. Den Beweis, dass Renin tatsächlich in der Nebenniere gebildet und nicht nur aus dem Blutkreislauf aufgenommen wird, lieferten Befunde an bilateral nephrektomierten Ratten. Der Verlust des systemischen Renin-Angiotensin-Systems stimulierte sowohl die adrenale Renin- wie auch Ang II-Produktion. Letzteres konnte selbst 20 Stunden nach Nephrektomie noch in Nebennierengewebe nachgewiesen werden [261–263]. Renin wurde außerdem in humanem Nebennierengewebe, humanen Nebennierentumoren sowie der von einem Nebennierenkarzinom abstammenden Zelllinie NCI-H295R gefunden [264–267]. Im Gegensatz zu Ratten konnten bei Mäusen Renin-positive Zellen im inneren Nebennierenkortex lokalisiert werden [268]. Während der fötalen Entwicklung der Maus (Tag 14–18 nach Befruchtung) wird der größte Teil des Renins in der Nebenniere und nicht in der Niere gebildet, während nach der Geburt die adrenale Expression deutlich abnimmt und die juxtaglomerulären Zellen der afferenten Arteriolen der Niere die Reninproduktion übernehmen [269, 270].

In der von uns durchgeführten Genechip-Analyse zeigten 1 Tage alte $Task3^{-/-}$ Mäuse (1d) eine fast 10-fach erhöhte adrenale Reninexpression im Vergleich zu Wildtyptieren (Tab. 1). Die Plasmareninkonzentration unterschied sich nicht zwischen den Genotypen (Abb. 14A), während der renale Reningehalt in $Task3^{-/-}$ Mäusen sogar abnahm (Abb. 14B), was wahrscheinlich als Kompensationsreaktion auf den Hyperaldosteronismus gedeutet werden kann. Begleitend zur Altersabhängigkeit des Hyperaldosteronismus sank die adrenale Reninexpression in $Task3^{-/-}$ Mäusen bis Tag 12 nach der Geburt stark ab und war in adulten Tieren quasi nicht mehr messbar (Abb. 12A). Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte die Reninexpression in der Zona fasciculata der Nebenniere 1d alter $Task3^{-/-}$ Mäuse lokalisiert werden (Abb. 13). Da $Task3$ in neugeborenen Wildtypmäusen weitgehend in Zellen der Zona glomerulosa exprimiert wird (Abb. 8A), überrascht die Lokalisation der Renin-produzierenden Zellen in der Zona fasciculata (anstatt der Zona glomerulosa) umso mehr.

Dennoch ist davon auszugehen, dass eine transiente, adrenale Reninexpression in der Zona fasciculata mitbeteiligt ist an der Entstehung des Hyperaldosteronismus in neugeborenen $Task3^{-/-}$ Mäusen. Möglicherweise stimulieren stark depolarisierte Glomerulosazellen mittels parakriner Wirkstoffe die Reninproduktion in der Zona fasciculata. Da auch die übrigen Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems (Angiotensinogen, Angiotensin-converting-enzyme) in Nebennieren-

gewebe nachgewiesen wurden [271], könnte das lokal aus der Zona fasciculata freigesetzte Renin die Bildung von Angiotensin II fördern, welches über AT_1 -Rezeptor-vermittelte Signalkaskaden (siehe Kapitel 1.4.1) die Aldosteronproduktion in Zellen der Zona glomerulosa antreibt. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine geringe Task3-Expression in der Zona fasciculata neonataler $Task3^{-/-}$ Mäuse vorliegt, die mittels Immunfluoreszenzfärbung nur schwer erkennbar ist. Somit könnte die Deletion von Task3 auch direkt die Funktion der Zellen der Zona fasciculata beeinflussen und eine pathologische Reninsekretion auslösen. Durch den Nachweis einer adrenalen, subkapsulären Stammzellpopulation ist es sehr wahrscheinlich, dass sich die Zellen der Zona fasciculata durch Differenzierungsprozesse und zentripetale Migration aus Zellen der Zona glomerulosa entwickeln [272]. Differenzierungsstörungen könnten dazu führen, dass Zellen trotz ihrer Lokalisation in der Zona fasciculata noch Zona glomerulosa-typische Zelleigenschaften tragen.

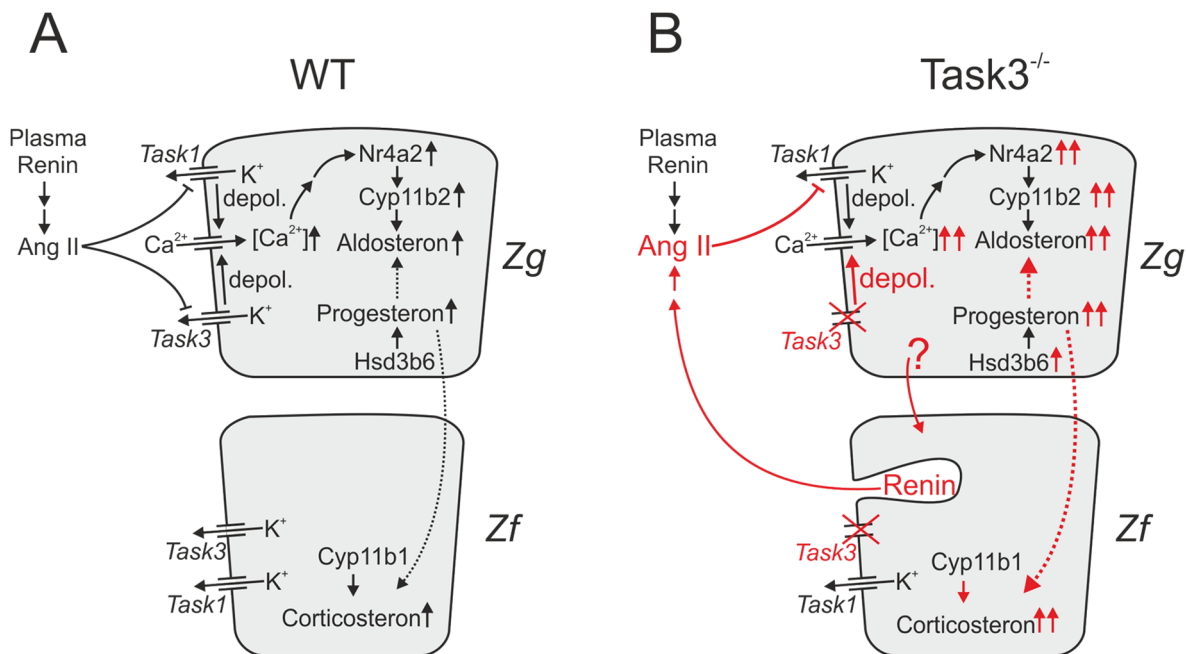


Abbildung 23: Möglicher Mechanismus zur Entstehung von Hyperaldosteronismus in 1 Tage alten $Task3^{-/-}$ Mäusen

In Wildtypmäusen (A) verleihen die Kaliumkanäle Task1 und Task3 adrenalen Zona glomerulosa (Zg)-Zellen eine hohe Kaliumhintergrundleitfähigkeit, was deren Plasmamembran stark hyperpolarisiert. Die Reninfreisetzung aus der Niere führt zu einem Anstieg von Angiotensin II (Ang II), das über den G-Protein-gekoppelten AT_1 -Rezeptor die Kaliumkanäle Task1 und Task3 in Zellen der Zona glomerulosa inhibiert. Die daraus resultierende Depolarisation aktiviert spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, wodurch das intrazelluläre Ca^{2+} ansteigt. CaM-Kinasen steigern über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nr4a2 die Transkription der Aldosteronsynthese und somit die Aldosteronproduktion. Hsd3b6 katalysiert die Umsetzung von Progesteron zu 11-Desoxycorticosteron, dem Substrat der Cyp11b2 in der Zona glomerulosa (Aldosteronproduktion) sowie der Cyp11b1 in der Zona fasciculata (Zf; Corticosteronproduktion). Bei der Entstehung von Hyperaldosteronismus in neugeborenen $Task3^{-/-}$ Mäusen (B) spielen vermutlich mehrere Mechanismen eine Rolle: (1) Deletion von Task3 führt zur Reduktion der Kaliumleitfähigkeit und dadurch zur Ang II-unabhängigen Depolarisation der Glomerulosazellen; (2) lokale Reninproduktion in der Zona fasciculata führt zur lokalen Ang II-Bildung und verstärkt dadurch die Depolarisation und den Anstieg des cytosolischen Ca^{2+} ; (3) erhöhte Progesteronsekretion in Zellen der Zona glomerulosa durch Hsd3b6 stimuliert Aldosteron- und Corticosteronproduktion aufgrund höherer Substratverfügbarkeit. Die abnormale adrenale Reninexpression wird möglicherweise durch eine veränderte Differenzierung, durch parakrine Faktoren aus der Zona glomerulosa oder direkt durch ein Fehlen von Task3 in der Zona fasciculata ausgelöst.

4.2 Pathophysiologie und Pharmakologie von APA-assoziierten KCNJ5-Mutanten

Mutationen im Kaliumkanal KCNJ5 werden in 40 % aller Aldosteron-produzierenden Adenome gefunden [273]. Diese Mutationen verleihen dem K^+ -Kanal eine unphysiologische Na^+ -Leitfähigkeit und - zumindest bei den G151R- und G151E-Mutationen - eine Ca^{2+} -Leitfähigkeit, was letztendlich die Ursache für die Entstehung des Adenoms und für die autonome Aldosteronsekretion darstellt [108, 214]. In dieser Arbeit wurde die Na^+ -Permeabilität und die daraus resultierende Depolarisation für die neu entdeckte KCNJ5 G151E-Mutation beschrieben. Weiterhin wurde anhand von adrenokortikalen NCI-Zellen der direkte Nachweis erbracht, dass die Depolarisation infolge von KCNJ5-Mutationen tatsächlich zu einem erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Level führt. Die Daten der Arbeit zeigen außerdem die Beteiligung des Na^+/Ca^{2+} -Austauschers NCX an der Pathophysiologie von KCNJ5-Mutationen. So können Störungen des transmembranären Na^+ -Gradienten die Transportrichtung des Na^+/Ca^{2+} -Austauschers umkehren, was neben der Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle zusätzlich die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht. Außerdem ändert die L168R-Mutation die pharmakologischen Eigenschaften des nativen KCNJ5-Kanals, wodurch dessen Sensitivität gegenüber Inhibitoren des Na^+ - und Ca^{2+} -Transports steigt.

4.2.1 Pathologischer Na^+ -Einstrom und Depolarisation in KCNJ5-mutierten Zellen

Choi *et al.* identifizierten 2011 drei unterschiedliche KCNJ5-Mutationen (G151R, L168R, T158A) in Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus [108]. Mittels Exom-Sequenzierung wurden seitdem weitere APA-assoziierte und Keimbahnmutationen des KCNJ5-Kanals entdeckt, die alle in der Nähe des Selektivitätsfilters liegen und den Kanal permeabel für Na^+ machen [212, 214, 215, 216, 274, 275]. Der von Choi *et al.* vorgeschlagene Mechanismus zur Entstehung von primärem Hyperaldosteronismus durch KCNJ5-Mutationen soll aus folgenden Schritten bestehen: (1) Depolarisation der Plasmamembran durch Na^+ -Einstrom, (2) Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Öffnung spannungsaktivierter Ca^{2+} -Kanäle und (3) erhöhte Aldosteronproduktion aufgrund Ca^{2+} -induzierter Cyp11b2-Transkription.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für eine von Dr. Paolo Mulatero (Universität Turin, Italien) identifizierte neue KCNJ5-Keimbahnmutation (G151E) der Verlust der K^+ -Sensitivität, der Na^+ -Einstrom und die Depolarisation in überexprimierenden HEK-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 16). Bei dem betroffenen Glycin 151 handelt es sich um das erste Glycin des GYG-Motifs, einer in allen Kaliumkanälen hoch konservierten Struktur des Selektivitätsfilters [276, 277]. Im Herzen bildet KCNJ5 funktionelle Kanäle durch Heteromerisierung mit KCNJ3 [222], weshalb zur

elektrophysiologischen Charakterisierung der KCNJ5 G151E-Mutation, ähnlich wie für andere Mutanten beschrieben, KCNJ3 kotransfiziert wurde. Generell beschränken sich die in der Literatur gefundenen Daten meist auf die elektrophysiologischen Eigenschaften mutierter KCNJ5-Kanäle in nicht steroidogenen Expressionssystemen [108, 210, 214, 215, 216, 218, 274].

Die zellulären Auswirkungen einer KCNJ5-Mutation in nativem Nebennierengewebe sind noch weitgehend unklar, weshalb sich diese Arbeit auf die Effekte der KCNJ5 L168R-Mutation auf adrenokortikale NCI-Zellen fokussierte. Von einer Kotransfektion mit KCNJ3 wurde hierbei abgesehen, da bisher nicht bekannt ist, ob der physiologische KCNJ5-Partner in der Nebenniere auch KCNJ3 ist. Stattdessen wurde davon ausgegangen, dass mögliche Bindungspartner endogen in NCI-Zellen exprimiert werden und so mit KCNJ5 funktionelle Heteromere ausbilden können. Dafür kommen beispielsweise andere adrenal exprimierte Mitglieder der KCNJ-Familie, wie KCNJ8 oder KCNJ12 in Frage [108]. Möglicherweise sind aber auch KCNJ5-Homomere in der Nebenniere aktiv. Allerdings wies der KCNJ5 WT-Kanal in NCI-Zellen unter Kontrollbedingungen keine messbare Kanalaktivität auf (Abb. 17A). Erst nach Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Konzentration über die Pipettenlösung war ein Tertiapin Q- (KCNJ5-Inhibitor) hemmbarer Strom messbar (Abb. 21A). Die Na^+ -Abhängigkeit G-Protein-aktivierter, einwärtsgerichteter Kaliumkanäle beschreibt bereits eine Arbeit von Lesage et al. und konnte an KCNJ5-transfizierten Kardiomyozyten der Ratte bestätigt werden [225, 278]. Im Gegensatz zu den Befunden von Oki *et al.* an HAC15-Zellen zeigte die Überexpression des KCNJ5 WT-Kanals in NCI-Zellen keinen Einfluss auf das Membranpotential (Abb. 17B) [279]. NCI-Zellen mit KCNJ5 L168R-Mutation waren hingegen bereits unter Kontrollbedingungen stark depolarisiert. Nach Wegnahme der extrazellulären Na^+ -Konzentration verschwand der beobachtete Einwärtsstrom und die Zellen hyperpolarisierten (Abb. 17A, B). KCNJ5-Mutationen führen zum Verlust der Ionenselektivität und unkontrolliertem Na^+ -Einstrom, einem Phänomen, das bereits für die G156S-Mutation (Weaver Mutation) des verwandten KCNJ6 Kanals beschrieben ist [280].

Der Anstieg der Na^+ -Leitfähigkeit durch mutierten KCNJ5 bewirkt einerseits unkontrollierte, chronische Aldosteronproduktion [229], führt aber auch zu Störungen der physiologischen intrazellulären Ionenkonzentrationen. Während Oki *et al.* in KCNJ5 T158A-transfizierten HAC15-Zellen nur einen sehr schwachen Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration verzeichneten (Fluoreszenzmessung mit Na^+ -sensitiven Farbstoff) [229], konnten wir mittels Flammenphotometrie eine Verdopplung der cytosolischen Na^+ -Konzentration in Lysaten von KCNJ5 L168R-exprimierenden NCI-Zellen beobachten (Daten nicht gezeigt; Fortsetzungsarbeiten von Julia Stindl). Vermutlich trägt eine Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Konzentration zusätzlich zur Aktivierung des mutierten KCNJ5-Kanals bei, was die pathologische Wirkung des mutierten Kanals sogar verschärfen würde.

4.2.2 Erhöhte Ca^{2+} -Aktivität in NCI-Zellen mit KCNJ5-Mutation

Die Aldosteronproduktion wird maßgeblich durch die Ca^{2+} -induzierte Cyp11b2-Transkription stimuliert. Entsprechend ist die Störung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts ein neuralgischer Punkt bei der Entstehung von Hyperaldosteronismus. Die Bedeutung der Ca^{2+} -Homöostase zeigt sich außerdem daran, dass kürzlich Mutationen einer membranständigen Ca^{2+} -ATPase (ATP2B3) und eines spannungsaktivierten Ca^{2+} -Kanals (CACNA1D) in Aldosteron-produzierenden Adenomen gefunden wurden [213, 275, 281, 282]. Auf zellulärer Ebene direkt nachgewiesen wurde die Erhöhung des cytosolischen Ca^{2+} bisher nur für KCNJ5 T158A in adrenokortikalen HAC15-Zellen und für KCNJ5 G151E bzw. Y152C in HEK-Zellen [216, 229]. Die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Fura2-Messungen an NCI-Zellen belegen außerdem die Ca^{2+} -erhöhende Wirkung der G151R- und L168R-Mutation (Abb. 18A). Nach dem von Choi *et al.* vorgeschlagenen Konzept sind spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle verantwortlich für den Ca^{2+} -Anstieg in Zellen mit mutiertem KCNJ5-Kanal. Zudem schreiben Scholl *et al.* dem mutierten KCNJ5-Kanal selbst Ca^{2+} -Permeabilität zu (indirekter Nachweis: Messung des Ba^{2+} -Stroms als Indikator für Ca^{2+} -Strom), wobei der direkte Beweis einer Ca^{2+} -Leitfähigkeit noch fehlt [214].

Verapamil, ein Blocker der L- und T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle [256], normalisierte das erhöhte Ca^{2+} -Level in KCNJ5 L168R-mutierten NCI-Zellen unter Kontrollbedingungen, während bei KCNJ5 WT-Zellen Verapamil-Effekte nur nach Stimulation mit Hoch- K^+ -Lösung zu beobachten waren (Abb. 19). In Übereinstimmung mit diesem Konzept reduziert Nifedipin (L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Blocker) in HAC15-Zellen mit KCNJ5-Mutation die Nr4a2, Cyp11b1 und Cyp11b2 mRNA-Expression sowie den Aldosterongehalt im Zellmedium [216, 229]. Diese Daten zeigen, dass eine starke Depolarisation der Plasmamembran, wie sie in Zellen mit KCNJ5-Mutation zu beobachten ist (Membranpotential ca. -12 mV; Abb. 17B), hauptsächlich durch die Öffnung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen beiträgt. Dementsprechend sollte die beobachtete Hyperpolarisation unter Na^+ -freier Badlösung (Abb. 17B) einen Abfall des Ca^{2+} -Signals in KCNJ5-mutierten NCI-Zellen (G151R, L168R, T158A) bewirken. Interessanterweise stieg die Ca^{2+} -Konzentration trotz hyperpolarisierter Zellmembran drastisch an (Abb. 18A).

Die pathologische Na^+ -Leitfähigkeit in Zellen mit mutiertem KCNJ5 führt zu einem Anstieg des cytosolischen Na^+ -Gehalts. Bei Wegnahme des extrazellulären Na^+ kehrt sich die Richtung des chemischen Na^+ -Gradienten um und damit auch die Transportrichtung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers NCX. Der Ca^{2+} -Import durch den sogenannte „reversed mode“ des NCX wurde beispielsweise in Kardiomyozyten, der glatten Muskulatur der Atemwege und in humanen Endothelzellen (VEGF-vermittelte Angiogenese) beschrieben [283–286]. Dabei bestimmen die transmembranären Gradienten von Na^+ und Ca^{2+} und das Membranpotential (Hyperpolarisation: Ca^{2+} -Export; Depolarisation: Ca^{2+} -Import) die Transportrichtung des NCX. In KCNJ5 L168R-mutierten NCI-Zellen

sank die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration nach Zugabe von KB-R7943, einem NCX-Inhibitor, unter Na^+ -freien wie auch unter physiologischen Bedingungen ab (Abb. 18B, C). Da allerdings einige Studien die Selektivität von KB-R7943 für NCX in Frage stellen [287–289], beweist der Abfall der Ca^{2+} -Konzentration unter KB-R7943 alleine nicht den „reversed mode“ von NCX in KCNJ5 L168R-mutierten NCI-Zellen. Dennoch liefern Depolarisation und intrazellulär erhöhte Na^+ -Konzentrationen optimale Voraussetzungen für eine mögliche Umkehr des NCX-Transports. Die Expression von NCX1 und unterschiedlichen NCKX-Isoformen ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -Austauscher) in Aldosteron-produzierenden Adenomen und humanem Nebennierengewebe (Abb. 20) unterstreicht zudem die Bedeutung der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in humanem, adrenalem Nativgewebe, wobei der endgültige Beweis eines „reversed mode“ von NCX noch aussteht.

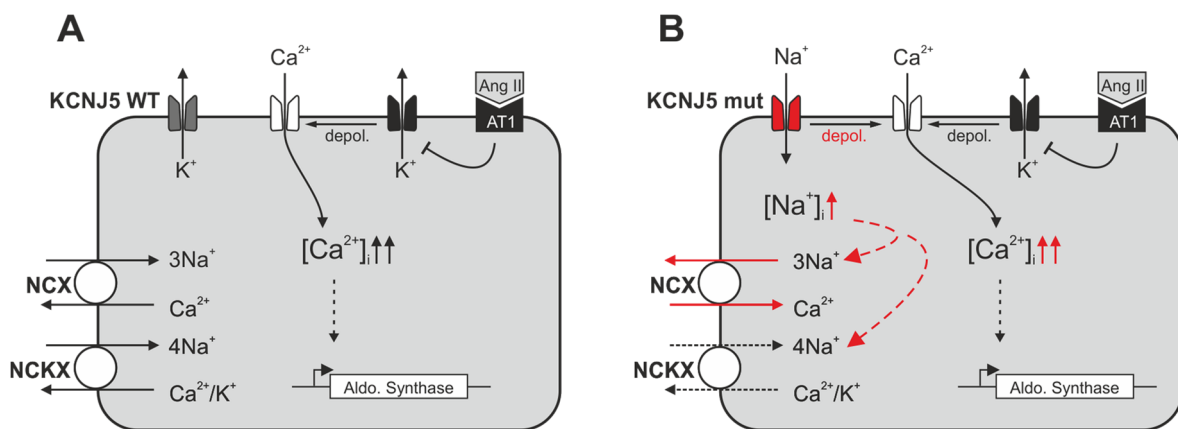


Abbildung 24: Vorgeschlagener Mechanismus zum NCX-Transport in Zellen mit KCNJ5 WT (A) und KCNJ5 mut (B)

KCNJ5 WT-Zellen (A) sind aufgrund hoher Kaliumhintergrundleitfähigkeit stark hyperpolarisiert, weshalb NCX und NCKX Calcium im Austausch gegen Natrium aus der Zelle transportieren. Die Aldosteronproduktion wird durch Angiotensin II und hohes Plasma- K^+ stimuliert, wobei der intrazelluläre Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration hauptsächlich auf die Öffnung spannungsaktivierter Ca^{2+} -Kanäle zurückgeht. Durch Mutationen im KCNJ5-Kanal (B), die den Kanal permeabel für Na^+ machen, ist die Plasmamembran adrenaler Zellen chronisch depolarisiert. Zusätzlich steigt die intrazelluläre Na^+ -Konzentration an, was zusammen mit der Depolarisation den NCX-Transport hemmt, möglicherweise sogar umkehrt. Im Falle von NCKX reicht die Triebkraft vermutlich nicht für eine Umkehr der Transportrichtung, da der NCKX-Transport zusätzlich vom K^+ -Gradienten abhängig ist.

4.2.3 Pharmakologie des mutierten KCNJ5-Kanals (L168R)

Somatische KCNJ5-Mutationen treten in Aldosteron-produzierenden Adenomen auf, die ursächlich für primären Hyperaldosteronismus und Bluthochdruck sind. Blutdrucksenkende Medikamente (z.B. Kalium-sparende Diuretika, Renininhibitoren, ACE-Blocker) können die Aldosteron-Renin-Ratio (ARR) beeinflussen, was die Diagnose von primärem Hyperaldosteronismus oft erschwert [102]. Vor diesem Hintergrund und zur therapeutischen Behandlung von

Patienten mit Aldosteron-produzierenden Adenomen ist es notwendig, die Auswirkungen der APA-assoziierten KCNJ5-Mutationen auf die Pharmakologie des Kanals zu kennen.

Tertiapin Q, ein bereits bekannter Inhibitor des KCNJ5 WT-Kanals [290, 291], besitzt nur eingeschränkte inhibitorische Wirkung auf den mutierten KCNJ5-Kanal. Während Murthy *et al.* eine Restleitfähigkeit für KCNJ5 I157del (56 %) und KCNJ5 T158A (54 %) unter Tertiapin Q beobachten konnten, belegen unsere Arbeiten an überexprimierenden NCI-Zellen einen kompletten Verlust der Tertiapin Q-Sensitivität durch die L168R-Mutation (Abb. 21A). Allerdings wurde Tertiapin Q in der Studie von Murthy *et al.* in einer viel geringeren Konzentration (50 nM) als in unserer Arbeit (1 μ M) verwendet und die Experimente wurden dort in *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt.

Mit einem IC_{50} -Wert $< 1 \mu$ M zeigten EIPA (Blocker des Na^+/H^+ -Austauscher) und der NCX-Blocker KB-R7943 die stärkste inhibitorische Wirkung auf KCNJ5 L168R (Abb. 22A, B), wobei diese Substanzen keine Zulassung für die Anwendung am Menschen haben. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass der von uns beobachtete Abfall der Ca^{2+} -Konzentration unter KB-R7943 in NCI-Zellen mit KCNJ5 L168R-Mutation (Abb. 18B, C) indirekt durch Inhibition des mutierten KCNJ5-Kanals und nicht nur durch direkte NCX-Inhibierung ausgelöst wird. Nach neuesten Befunden besitzt KB-R7943 im Herzen sogar eine stärkere inhibitorische Wirkung auf Acetylcholin-aktivierte Kaliumkanäle (wie der KCNJ5 Kanal) als auf NCX [289].

KCNJ5 L168R wurde außerdem nur schwach von Amilorid, einem Kalium-sparenden Diuretikum, und Diltiazem, einem Ca^{2+} -Kanalblocker, gehemmt (Abb. 22C, E). Deutlich stärker inhibierte der Ca^{2+} -Kanalblocker Verapamil ($IC_{50} = 1.2 \mu$ M) den KCNJ5 L168R-Strom in NCI-Zellen (Abb. 22D). Verapamil scheint somit offenbar auf zwei unterschiedlichen Wegen die Aldosteronproduktion in KCNJ5-mutierten Zellen verringern zu können: (1) direkte Inhibierung des pathologischen Na^+ -Einwärtsstroms durch mutierten KCNJ5 und (2) Inhibierung der depolarisationsaktivierten L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle. Verapamil wird aufgrund seiner gefäßerweiternden und frequenzsenkenden Wirkung im Herzen häufig zur Blutdrucksenkung eingesetzt. Da es im Vergleich zu anderen blutdrucksenkenden Medikamenten nur geringe Auswirkungen auf die Aldosteron-Renin-Ratio besitzt, eignet es sich besonders zur Behandlung von PA-Patienten im Vorfeld zu laborchemischer Diagnostik [102, 292]. Bei Patienten mit APA-assoziierten KCNJ5-Mutationen könnte Verapamil allerdings aufgrund direkter Inhibierung des mutierten KCNJ5-Kanals durchaus Aldosteron-senkend wirken. Dies würde eine Normalisierung der Aldosteron-Renin-Ratio bewirken und so möglicherweise die korrekte Diagnose eines primären Hyperaldosteronismus verhindern. Nichtsdestotrotz könnte Verapamil, möglicherweise auch in Kombination mit Amilorid, zur therapeutischen Behandlung von Hyperaldosteronismus von Nutzen sein, besonders bei Patienten mit KCNJ5-Mutationen.

4.3 Bedeutung von Kaliumkanälen für die Pathophysiologie von primärem Hyperaldosteronismus

Dass das Fehlen oder die Funktionsstörung von adrenalen Kaliumkanälen maßgeblich an der Entstehung von primärem Hyperaldosteronismus (PA) beteiligt sind, konnte in dieser Arbeit durch die Aufklärung der zellulären Hintergründe eines altersabhängigen Hyperaldosteronismus in Task3^{-/-} Mäusen und durch die Untersuchung der zellulären Konsequenzen APA-assoziiierter KCNJ5-Mutationen untermauert werden.

Studien an knockout Mausmodellen verdeutlichten die Beteiligung der Kaliumkanäle Task1 und Task3 an der Regulation der Aldosteronproduktion bzw. der Pathogenese von primärem Hyperaldosteronismus [139, 187, 190, 191]. Während die adrenalen Symptome der Task1^{-/-} Maus einer humanen Glukokortikoid-behandelbaren Form von primärem Hyperaldosteronismus ähneln, erinnert die autonome Aldosteronproduktion mit charakteristisch erhöhter Aldosteron-Renin-Ratio in Task3^{-/-} Mäusen an das Krankheitsbild von Patienten mit idiopathischem Hyperaldosteronismus. Idiopathisch bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Ursache der überhöhten Aldosteronproduktion in diesen Patienten noch unklar ist. Obwohl Assoziationsstudien einen möglichen Link zwischen Task3 und erhöhtem Bluthochdruckrisiko beschreiben [209], konnten bis heute in PA-Patienten weder somatische noch Keimbahnmutationen in Task-Kanälen gefunden werden.

Nach neuesten Befunden scheint vielmehr der in humanem Nebennierengewebe stark exprimierte Kaliumkanal KCNJ5 an der Entstehung von primärem Hyperaldosteronismus beteiligt zu sein [108]. Bis heute wurden neun unterschiedliche KCNJ5-Mutationen in Aldosteronproduzierenden Adenomen und der Keimbahn von Patienten mit familiär vererbtem Hyperaldosteronismus beschrieben [108, 210, 211, 213, 214, 215, 275]. Funktionelle Untersuchungen der KCNJ5-Mutationen in heterologen Expressionssystemen machen einen pathologischen Na⁺-Einstrom durch den mutierten Kanal hauptverantwortlich für autonome Aldosteronproduktion beim Menschen. Über die physiologische Rolle von KCNJ5 in nativem Nebennierengewebe ist hingegen wenig bekannt. Oki *et al.* vermuten eine Beteiligung von KCNJ5 bei der Ang II-induzierten Aldosteronproduktion [279]. Zudem bleiben viele Fragen noch unbeantwortet im Hinblick auf die von Choi *et al.* vorgeschlagene proliferationsfördernde Wirkung der KCNJ5-Mutationen im Rahmen der Adenomentstehung:

- Wie trägt der durch KCNJ5-Mutationen vermittelte Anstieg der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration zur Adenomentstehung bei?
- Warum entwickeln Patienten mit KCNJ5-Keimbahnmutation keine Nebennierenadenome?

- Warum führt der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aufgrund einer Depolarisation der Glomerulosazellen zur Adenombildung beim Menschen (bedingt durch KCNJ5-Mutation), aber nicht bei Mäusen (bedingt durch Deletion von Task-Kanälen)?

Diese Arbeit konnte durch den Nachweis neuer regulatorischer Mechanismen und Faktoren der Aldosteronproduktion dazu beitragen, die Entstehung von primärem Hyperaldosteronismus auf zellulärer Ebenen besser verstehen zu können. Möglicherweise helfen diese Befunde auch zukünftig bei der Klärung der noch offenen Fragen. Durch die Identifizierung potentieller Blocker des mutierten KCNJ5-Kanals wurden außerdem neue Möglichkeiten zur Therapie von Patienten mit Aldosteron-produzierendem Adenom aufgezeigt.

5. Zusammenfassung

In 10 % aller Bluthochdruckpatienten wird ein primärer Hyperaldosteronismus (PA), eine unkontrollierte Überproduktion des Mineralokortikoids Aldosteron, als Krankheitsursache diagnostiziert. Aldosteron wird in den Zellen der Zona glomerulosa der Nebenniere produziert und aktiviert die Na^+ -Rückresorption und K^+ -Sekretion in der Niere. Bei der Stimulation der Aldosteronsynthese durch das Renin-Angiotensin-System und durch Hyperkaliämie kommt es zu einer Depolarisation der Zellen der Zona glomerulosa, einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch die Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und letztendlich zur Ca^{2+} -induzierten Transkription der Aldosteronsynthase CYP11B2. Somit ist das Membranpotential der Glomerulosazellen von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Aldosteronsekretion. Hauptverantwortlich zur Aufrechterhaltung des hyperpolarisierten Ruhemembranpotentials sind dabei die Kaliumkanäle der TASK-Familie. $\text{Task1}^{-/-}$ sowie $\text{Task3}^{-/-}$ Mäuse wiesen einen primären Hyperaldosteronismus auf, wobei dieser im Falle von Task3 in neugeborenen Tieren deutlich ausgeprägter war als in adulten Tieren. Auch beim Menschen ist die Kontrolle des Membranpotentials der Glomerulosazellen von großer Bedeutung. So führen somatische Mutationen des Kaliumkanals KCNJ5 in der Nebenniere zur Entstehung von Aldosteron-produzierenden Adenomen (APA).

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der zellulären Mechanismen, die der Pathogenese von primärem Hyperaldosteronismus in neugeborenen $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen zugrunde liegen. Des Weiteren war die Untersuchung der zellulären Auswirkungen von KCNJ5-Mutationen Gegenstand dieser Arbeit. Dabei wurden insbesondere die funktionellen Defekte, die Störung der Ca^{2+} -Homöostase in mutierten Zellen und die pharmakologischen Eigenschaften des mutierten Kanals erforscht.

Die Deletion von Task3 führte in Mäusen zu einem altersabhängigen Hyperaldosteronismus, der sich innerhalb der ersten beiden Wochen normalisierte. Die Plasmakonzentrationen von Corticosteron und Progesteron (Vorstufen von Aldosteron) zeigten eine ähnliche altersabhängige Erhöhung, was auf eine weitreichende Fehlfunktion der Nebennierenrinde hinwies. Um zu überprüfen, welche transkriptionellen Veränderungen mit dem Phänotyp der neonatalen Task3-Maus einhergehen, wurde eine Analyse des adrenalen Expressionsprofils (Genechip) durchgeführt. Diese lieferte mehrere interessante Kandidaten, die zur erhöhten Steroidhormonproduktion in neugeborenen $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen beitragen, aber auch Kandidaten, die vermutlich bei der Kompensation des Phänotyps in adulten Tieren beteiligt sind. Am überraschendsten war dabei der Nachweis einer extrarenalen Renin-Expression in den Nebennieren neonataler $\text{Task3}^{-/-}$ Mäuse. Offensichtlich trägt in neugeborenen $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen nicht alleine der Verlust der Kaliumleitfähigkeit, sondern auch die parakrine Wirkung eines lokalen, adrenalen Renin-Angiotensin-Systems zur Altersabhängigkeit des Hyperaldosteronismus in $\text{Task3}^{-/-}$ Mäusen bei.

Beim Menschen sind hingegen nach neuesten Befunden Mutationen des Kaliumkanals KCNJ5 an der Entstehung von primärem Hyperaldosteronismus beteiligt. Die in Aldosteron-produzierenden Adenomen gefundenen KCNJ5-Mutationen führen zu einem pathologischen Verlust der Ionenselektivität des Kanals. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Na⁺-Durchlässigkeit und depolarisierende Wirkung der G151E-Mutation beschrieben. Der für die Aldosteronproduktion essentielle Anstieg der intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration wurde zudem in einem Adenom-ähnlichen Zellmodell für die drei häufigsten APA-assoziierten KCNJ5-Mutationen nachgewiesen. Dabei wurde neben der klassischen Aktivierung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle ein für Nebennieren-Zellen noch unbeschriebener Ca²⁺-Import-Weg über den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX) beobachtet. Die pharmakologische Charakterisierung der KCNJ5 L168R-Mutation lieferte überraschende Befunde, wie die Inhibierung des mutierten Kanals durch Blocker des Na⁺- und Ca²⁺-Transports. Der Nachweis der inhibitorischen Wirkung von Verapamil ist dabei von besonderer klinischer Relevanz, da Verapamil bereits als Blutdruck-senkendes Medikament in Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus eingesetzt wird. Die in dieser Arbeit erhobenen pharmakologischen Befunde bieten eine vielversprechende Basis zur Verbesserung der therapeutischen Behandlungsmethoden von Patienten mit Aldosteron-produzierendem Adenom. Zusammenfassend verdeutlichen die Daten dieser Arbeit die Wichtigkeit von Kaliumkanälen zur Regulation der Aldosteronsynthese und wie Funktionsverluste dieser Kanäle auf unterschiedliche Weise zur Entstehung von primärem Hyperaldosteronismus beitragen können.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Egan, B.M., Zhao, Y. and Axon, R.N. (2010) US trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension, 1988-2008. *JAMA* 303, 2043–2050.
- [2] Labeit, A.M., Klotsche, J., Pieper, L., Pittrow, D., Einsle, F., Stalla, G.K., Lehnert, H., Silber, S., Zeiher, A.M., Marz, W., Wehling, M. and Wittchen, H.-U. (2012) Changes in the prevalence, treatment and control of hypertension in Germany? A clinical-epidemiological study of 50.000 primary care patients. *PLoS One* 7, e52229.
- [3] Vasan, R.S., Evans, J.C., Larson, M.G., Wilson, Peter W F, Meigs, J.B., Rifai, N., Benjamin, E.J. and Levy, D. (2004) Serum aldosterone and the incidence of hypertension in nonhypertensive persons. *N Engl J Med* 351, 33–41.
- [4] Tsutamoto, T., Sakai, H., Tanaka, T., Fujii, M., Yamamoto, T., Wada, A., Ohnishi, M. and Horie, M. (2007) Comparison of active renin concentration and plasma renin activity as a prognostic predictor in patients with heart failure. *Circ J* 71, 915–921.
- [5] Guder, G., Bauersachs, J., Frantz, S., Weismann, D., Allolio, B., Ertl, G., Angermann, C.E. and Stork, S. (2007) Complementary and incremental mortality risk prediction by cortisol and aldosterone in chronic heart failure. *Circulation* 115, 1754–1761.
- [6] Beygui, F., Collet, J.-P., Benoliel, J.-J., Vignolles, N., Dumaine, R., Barthelemy, O. and Montalescot, G. (2006) High plasma aldosterone levels on admission are associated with death in patients presenting with acute ST-elevation myocardial infarction. *Circulation* 114, 2604–2610.
- [7] Tylicki, L., Larczynski, W. and Rutkowski, B. (2005) Renal protective effects of the renin-angiotensin-aldosterone system blockade: from evidence-based approach to perspectives. *Kidney Blood Press Res* 28, 230–242.
- [8] Mornet, E., Dupont, J., Vitek, A. and White, P.C. (1989) Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11) beta). *J. Biol. Chem.* 264, 20961–20967.
- [9] Chua, S.C., Szabo, P., Vitek, A., Grzeschik, K.H., John, M. and White, P.C. (1987) Cloning of cDNA encoding steroid 11 beta-hydroxylase (P450c11). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7193–7197.
- [10] Kawamoto, T., Mitsuchi, Y., Toda, K., Yokoyama, Y., Miyahara, K., Miura, S., Ohnishi, T., Ichikawa, Y., Nakao, K. and Imura, H. (1992) Role of steroid 11 beta-hydroxylase and steroid 18-hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1458–1462.
- [11] Domalik, L.J., Chaplin, D.D., Kirkman, M.S., Wu, R.C., Liu, W.W., Howard, T.A., Seldin, M.F. and Parker, K.L. (1991) Different isozymes of mouse 11 beta-hydroxylase produce mineralocorticoids and glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* 5, 1853–1861.
- [12] Ogishima, T., Suzuki, H., Hata, J., Mitani, F. and Ishimura, Y. (1992) Zone-specific expression of aldosterone synthase cytochrome P-450 and cytochrome P-45011 beta in rat adrenal cortex: histochemical basis for the functional zonation. *Endocrinology* 130, 2971–2977.
- [13] LeHoux, J.G., Martel, D., LeHoux, J., Ducharme, L., Lefebvre, A. and Brière, N. (1995) P450aldo in hamster adrenal cortex: immunofluorescent and immuno-gold electron microscopic studies. *Endocr. Res.* 21, 275–280.
- [14] Pascoe, L., Jeunemaitre, X., Lebrethon, M.C., Curnow, K.M., Gomez-Sanchez, C.E., Gasc, J.M., Saez, J.M. and Corvol, P. (1995) Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism and adrenal tumors occurring in a single French pedigree. *J. Clin. Invest.* 96, 2236–2246.
- [15] Young, L.S., Murphy, G., Kelly, S.N., Smith, T.P., Cunningham, S.K. and Joseph McKenna, T. (2003) Differential production of adrenal steroids by purified cells of the human adrenal cortex is relative rather than absolute. *Eur. J. Endocrinol.* 148, 139–145.
- [16] Wada, A., Ohnishi, T., Nonaka, Y., Okamoto, M. and Yamano, T. (1985) Synthesis of aldosterone by a reconstituted system of cytochrome P-45011 beta from bovine adrenocortical mitochondria. *J. Biochem.* 98, 245–256.
- [17] Yanagibashi, K., Haniu, M., Shively, J.E., Shen, W.H. and Hall, P. (1986) The synthesis of aldosterone by the adrenal cortex. Two zones (fasciculata and glomerulosa) possess one enzyme for 11 beta-, 18-hydroxylation, and aldehyde synthesis. *J. Biol. Chem.* 261, 3556–3562.
- [18] Boon, W.C., Roche, P.J., Hammond, V.E., Jeyaseelan, K., Crawford, R.J. and Coghlan, J.P. (1995) Cloning and expression analysis of a cytochrome P-450(11 beta) cDNA in sheep. *Biochim. Biophys. Acta* 1260, 109–112.
- [19] Nonaka, Y., Takemori, H., Halder, S.K., Sun, T., Ohta, M., Hatano, O., Takakusu, A. and Okamoto, M. (1995) Frog cytochrome P-450 (11 beta,aldo), a single enzyme involved in the final steps of glucocorticoid and mineralocorticoid biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 229, 249–256.
- [20] Ulfig, N. (2005) *Kurzlehrbuch Histologie*. [nach dem neuen GK 1]. Thieme. Stuttgart, New York.
- [21] Iki, T. (2005) *Zur Struktur und Funktion der Nebenniere bei den Haussäugetieren*. Dissertation, LMU München.
- [22] Mesiano, S., Coulter, C.L. and Jaffe, R.B. (1993) Localization of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase/17, 20-lyase, and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase steroidogenic enzymes in human and rhesus monkey fetal adrenal glands: reappraisal of functional zonation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 1184–1189.

- [23] McNutt, N.S. and Jones, A.L. (1970) Observations on the ultrastructure of cytodifferentiation in the human fetal adrenal cortex. *Lab. Invest.* 22, 513–527.
- [24] Keene, M.F. (1927) Observations on the Development of the Human Suprarenal Gland. *J. Anat.* 61, 302–324.
- [25] Uotila, U.U. (1940) The early embryological development of the fetal and permanent adrenal cortex in man. *The Anatomical Record* 76, 183–203.
- [26] Sucheston, M.E. and Cannon, M.S. (1968) Development of zonular patterns in the human adrenal gland. *J. Morphol.* 126, 477–491.
- [27] Mesiano, S. and Jaffe, R.B. (1997) Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr. Rev.* 18, 378–403.
- [28] Cooper, M.J., Hutchins, G.M. and Israel, M.A. (1990) Histogenesis of the human adrenal medulla. An evaluation of the ontogeny of chromaffin and nonchromaffin lineages. *Am. J. Pathol.* 137, 605–615.
- [29] Ehrhart-Bornstein, M., Breidert, M., Guadanucci, P., Wozniak, W., Bocian-Sobkowska, J., Malendowicz, L.K. and Bornstein, S.R. (1997) 17 alpha-Hydroxylase and chromogranin A in 6th week human fetal adrenals. *Horm. Metab. Res.* 29, 30–32.
- [30] Hanley, N.A., Rainey, W.E., Wilson, D.I., Ball, S.G. and Parker, K.L. (2001) Expression profiles of SF-1, DAX1, and CYP17 in the human fetal adrenal gland: potential interactions in gene regulation. *Mol. Endocrinol.* 15, 57–68.
- [31] Narasaka, T., Suzuki, T., Moriya, T. and Sasano, H. (2001) Temporal and spatial distribution of corticosteroidogenic enzymes immunoreactivity in developing human adrenal. *Mol. Cell. Endocrinol.* 174, 111–120.
- [32] Coulter, C.L. and Jaffe, R.B. (1998) Functional maturation of the primate fetal adrenal in vivo: 3. Specific zonal localization and developmental regulation of CYP21A2 (P450c21) and CYP11B1/CYP11B2 (P450c11/aldosterone synthase) lead to integrated concept of zonal and temporal steroid biosynthesis. *Endocrinology* 139, 5144–5150.
- [33] Howard-Miller, E. (1927) A transitory zone in the adrenal cortex which shows age and sex relationships. *American Journal of Anatomy* 40, 251–293.
- [34] Zubair, M., Ishihara, S., Oka, S., Okumura, K. and Morohashi, K.-i. (2006) Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development: initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 complex and maintenance via autoregulation by Ad4BP/SF-1. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4111–4121.
- [35] Morohashi, K.-i. and Zubair, M. (2011) The fetal and adult adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol* 336, 193–197.
- [36] Holmes, P.V. and Dickson, A.D. (1971) X-zone degeneration in the adrenal glands of adult and immature female mice. *J. Anat.* 108, 159–168.
- [37] Gasparo, M. de, Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W. and Unger, T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 415–472.
- [38] Bader, M. and Ganten, D. (2008) Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med (Berl)* 86, 615–621.
- [39] Fuller, P.J. and Young, M.J. (2005) Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension* 46, 1227–1235.
- [40] Thomas, W. and Harvey, B.J. (2011) Mechanisms underlying rapid aldosterone effects in the kidney. *Annu Rev Physiol* 73, 335–357.
- [41] McCormick, J.A., Bhalla, V., Pao, A.C. and Pearce, D. (2005) SGK1: a rapid aldosterone-induced regulator of renal sodium reabsorption. *Physiology (Bethesda)* 20, 134–139.
- [42] Vallon, V., Wulff, P., Huang, D.Y., Loffing, J., Volkl, H., Kuhl, D. and Lang, F. (2005) Role of Sgk1 in salt and potassium homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R4-10.
- [43] Muller, O.G., Parnova, R.G., Centeno, G., Rossier, B.C., Firsov, D. and Horisberger, J.-D. (2003) Mineralocorticoid effects in the kidney: correlation between alphaENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA expression and urinary excretion of Na⁺ and K⁺. *J Am Soc Nephrol* 14, 1107–1115.
- [44] Musch, M.W., Lucioni, A. and Chang, E.B. (2008) Aldosterone regulation of intestinal Na absorption involves SGK-mediated changes in NHE3 and Na⁺ pump activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295, G909-19.
- [45] Beguin, P., Crambert, G., Guennoun, S., Garty, H., Horisberger, J.D. and Geering, K. (2001) CHIF, a member of the FXFD protein family, is a regulator of Na,K-ATPase distinct from the gamma-subunit. *EMBO J* 20, 3993–4002.
- [46] Yoo, D., Kim, B.Y., Campo, C., Nance, L., King, A., Maouyo, D. and Welling, P.A. (2003) Cell surface expression of the ROMK (Kir 1.1) channel is regulated by the aldosterone-induced kinase, SGK-1, and protein kinase A. *J Biol Chem* 278, 23066–23075.
- [47] Cho, J.H., Musch, M.W., Bookstein, C.M., McSwine, R.L., Rabenau, K. and Chang, E.B. (1998) Aldosterone stimulates intestinal Na⁺ absorption in rats by increasing NHE3 expression of the proximal colon. *Am. J. Physiol.* 274, C586-94.
- [48] Kim, G.H., Masilamani, S., Turner, R., Mitchell, C., Wade, J.B. and Knepper, M.A. (1998) The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14552–14557.
- [49] Trapp, T. and Holsboer, F. (1995) Ligand-induced conformational changes in the mineralocorticoid receptor analyzed by protease mapping. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 286–291.
- [50] Fejes-Toth, G., Pearce, D. and Naray-Fejes-Toth, A. (1998) Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2973–2978.

- [51] Rogerson, F.M., Brennan, F.E. and Fuller, P.J. (2004) Mineralocorticoid receptor binding, structure and function. *Mol Cell Endocrinol* 217, 203–212.
- [52] Odermatt, A., Arnold, P. and Frey, F.J. (2001) The intracellular localization of the mineralocorticoid receptor is regulated by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *J Biol Chem* 276, 28484–28492.
- [53] Rogerson, F.M. and Fuller, P.J. (2000) Mineralocorticoid action. *Steroids* 65, 61–73.
- [54] Bhargava, A., Fullerton, M.J., Myles, K., Purdy, T.M., Funder, J.W., Pearce, D. and Cole, T.J. (2001) The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology* 142, 1587–1594.
- [55] Stockand, J.D. (2002) New ideas about aldosterone signaling in epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F559–76.
- [56] Naray-Fejes-Toth, A., Helms, M.N., Stokes, J.B. and Fejes-Toth, G. (2004) Regulation of sodium transport in mammalian collecting duct cells by aldosterone-induced kinase, SGK1: structure/function studies. *Mol Cell Endocrinol* 217, 197–202.
- [57] Snyder, P.M., Olson, D.R. and Thomas, B.C. (2002) Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *J Biol Chem* 277, 5–8.
- [58] Lombes, M., Alfaidy, N., Eugene, E., Lessana, A., Farman, N. and Bonvalet, J.P. (1995) Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation* 92, 175–182.
- [59] Roland, B.L., Krozowski, Z.S. and Funder, J.W. (1995) Glucocorticoid receptor, mineralocorticoid receptors, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-1 and -2 expression in rat brain and kidney: in situ studies. *Mol Cell Endocrinol* 111, R1–7.
- [60] Takeda, Y., Miyamori, I., Inaba, S., Furukawa, K., Hatakeyama, H., Yoneda, T., Mabuchi, H. and Takeda, R. (1997) Vascular aldosterone in genetically hypertensive rats. *Hypertension* 29, 45–48.
- [61] Brilla, C.G. and Weber, K.T. (1992) Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 120, 893–901.
- [62] Young, M., Fullerton, M., Dilley, R. and Funder, J. (1994) Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *J Clin Invest* 93, 2578–2583.
- [63] Funder, J.W. (1995) Steroids, hypertension and cardiac fibrosis. *Blood Press Suppl* 2, 39–42.
- [64] Rocha, R. and Stier, C T Jr (2001) Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues. *Trends Endocrinol Metab* 12, 308–314.
- [65] Sakai, R.R., Ma, L.Y., Zhang, D.M., McEwen, B.S. and Fluharty, S.J. (1996) Intracerebral administration of mineralocorticoid receptor antisense oligonucleotides attenuate adrenal steroid-induced salt appetite in rats. *Neuroendocrinology* 64, 425–429.
- [66] Kageyama, Y. and Bravo, E.L. (1988) Hypertensive mechanisms associated with centrally administered aldosterone in dogs. *Hypertension* 11, 750–753.
- [67] Peysner, K., Henry, C.A. and Malvin, R.L. (1990) Central infusion of aldosterone increases blood pressure by mechanisms independent of Na retention. *Clin Exp Hypertens A* 12, 399–414.
- [68] Gomez-Sanchez, E.P., Fort, C.M. and Gomez-Sanchez, C.E. (1990) Intracerebroventricular infusion of RU28318 blocks aldosterone-salt hypertension. *Am J Physiol* 258, E482–4.
- [69] Janiak, P.C., Lewis, S.J. and Brody, M.J. (1990) Role of central mineralocorticoid binding sites in development of hypertension. *Am J Physiol* 259, R1025–34.
- [70] Falkenstein, E., Tillmann, H.C., Christ, M., Feuring, M. and Wehling, M. (2000) Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52, 513–556.
- [71] Harvey, B.J., Condliffe, S. and Doolan, C.M. (2001) Sex and salt hormones: rapid effects in epithelia. *News Physiol Sci* 16, 174–177.
- [72] Losel, R., Schultz, A. and Wehling, M. (2004) A quick glance at rapid aldosterone action. *Mol Cell Endocrinol* 217, 137–141.
- [73] Wehling, M., Kasmayr, J. and Theisen, K. (1991) Rapid effects of mineralocorticoids on sodium-proton exchanger: genomic or nongenomic pathway? *Am J Physiol* 260, E719–26.
- [74] Funder, J.W. (2005) The nongenomic actions of aldosterone. *Endocr Rev* 26, 313–321.
- [75] Zhu, Y., Bond, J. and Thomas, P. (2003) Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2237–2242.
- [76] Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B. and Prossnitz, E.R. (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307, 1625–1630.
- [77] Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J. and Dong, J. (2005) Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 624–632.
- [78] Eisen, C., Meyer, C., Christ, M., Theisen, K. and Wehling, M. (1994) Novel membrane receptors for aldosterone in human lymphocytes: a 50 kDa protein on SDS-PAGE. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 40, 351–358.

- [79] Alzamora, R., Michea, L. and Marusic, E.T. (2000) Role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in nongenomic aldosterone effects in human arteries. *Hypertension* 35, 1099–1104.
- [80] Mason, J.I. and Rainey, W.E. (1987) Steroidogenesis in the human fetal adrenal: a role for cholesterol synthesized de novo. *J Clin Endocrinol Metab* 64, 140–147.
- [81] Gwynne, J.T. and Strauss, J F 3rd (1982) The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev* 3, 299–329.
- [82] Stocco, D.M. (2001) StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 63, 193–213.
- [83] Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J F 3rd, Clark, B.J., Stocco, D.M., Saenger, P., Rogol, A. and Miller, W.L. (1995) Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 267, 1828–1831.
- [84] Caron, K.M., Soo, S.C., Wetsel, W.C., Stocco, D.M., Clark, B.J. and Parker, K.L. (1997) Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11540–11545.
- [85] Lieberman, S. and Lin, Y.Y. (2001) Reflections on sterol sidechain cleavage process catalyzed by cytochrome P450(scc). *J Steroid Biochem Mol Biol* 78, 1–14.
- [86] Keeney, D.S., Naville, D., Milewich, L., Bartke, A. and Mason, J.I. (1993) Multiple isoforms of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5 \rightarrow 4-isomerase in mouse tissues: male-specific isoforms are expressed in the gonads and liver. *Endocrinology* 133, 39–45.
- [87] Simard, J., Couet, J., Durocher, F., Labrie, Y., Sanchez, R., Breton, N., Turgeon, C. and Labrie, F. (1993) Structure and tissue-specific expression of a novel member of the rat 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 β -HSD) family. The exclusive 3 β -HSD gene expression in the skin. *J Biol Chem* 268, 19659–19668.
- [88] Simard, J., Ricketts, M.-L., Gingras, S., Soucy, P., Feltus, F.A. and Melner, M.H. (2005) Molecular biology of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocr Rev* 26, 525–582.
- [89] Shinzawa, K., Ishibashi, S., Murakoshi, M., Watanabe, K., Kominami, S., Kawahara, A. and Takemori, S. (1988) Relationship between zonal distribution of microsomal cytochrome P-450s (P-450(17) α -lyase and P-450C21) and steroidogenic activities in guinea-pig adrenal cortex. *J Endocrinol* 119, 191–200.
- [90] Payne, A.H. and Hales, D.B. (2004) Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr. Rev.* 25, 947–970. doi:10.1210/er.2003-0030.
- [91] Gomez-Sanchez, C.E., Zhou, M.Y., Cozza, E.N., Morita, H., Foecking, M.F. and Gomez-Sanchez, E.P. (1997) Aldosterone biosynthesis in the rat brain. *Endocrinology* 138, 3369–3373.
- [92] Silvestre, J.S., Robert, V., Heymes, C., Aupetit-Faisant, B., Mouas, C., Moalic, J.M., Swynghedauw, B. and Delcayre, C. (1998) Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem* 273, 4883–4891.
- [93] White, P.C., Curnow, K.M. and Pascoe, L. (1994) Disorders of steroid 11 β -hydroxylase isozymes. *Endocr Rev* 15, 421–438.
- [94] Curnow, K.M., Tusie-Luna, M.T., Pascoe, L., Natarajan, R., Gu, J.L., Nadler, J.L. and White, P.C. (1991) The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol Endocrinol* 5, 1513–1522.
- [95] Nawroth, P.P. and Nawroth-Ziegler. (2001) *Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel. Mit 242 Tabellen.* Springer. Berlin [u.a.].
- [96] Carey, R.M. (2009) Primary aldosteronism. *Horm Res* 71 Suppl 1, 8–12.
- [97] Newton-Cheh, C., Guo, C.-Y., Gona, P., Larson, M.G., Benjamin, E.J., Wang, T.J., Kathiresan, S., O'Donnell, C.J., Musone, S.L., Camargo, A.L., Drake, J.A., Levy, D., Hirschhorn, J.N. and Vasan, R.S. (2007) Clinical and genetic correlates of aldosterone-to-renin ratio and relations to blood pressure in a community sample. *Hypertension* 49, 846–856.
- [98] Meneton, P., Galan, P., Bertrais, S., Heudes, D., Hercberg, S. and Menard, J. (2008) High plasma aldosterone and low renin predict blood pressure increase and hypertension in middle-aged Caucasian populations. *J Hum Hypertens* 22, 550–558.
- [99] Mulatero, P., Stowasser, M., Loh, K.-C., Fardella, C.E., Gordon, R.D., Mosso, L., Gomez-Sanchez, C.E., Veglio, F. and Young, William F Jr (2004) Increased diagnosis of primary aldosteronism, including surgically correctable forms, in centers from five continents. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 1045–1050.
- [100] Hannemann, A. and Wallaschofski, H. (2012) Prevalence of primary aldosteronism in patient's cohorts and in population-based studies--a review of the current literature. *Horm Metab Res* 44, 157–162.
- [101] Hannemann, A., Friedrich, N., Ludemann, J., Volzke, H., Rettig, R., Peters, J., Reincke, M., Doring, A., Nauck, M. and Wallaschofski, H. (2010) Reference intervals for aldosterone, renin, and the aldosterone-to-renin ratio in the population-based Study of Health in Pomerania (SHIP-1). *Horm Metab Res* 42, 392–399.
- [102] Funder, J.W., Carey, R.M., Fardella, C., Gomez-Sanchez, C.E., Mantero, F., Stowasser, M., Young, William F Jr and Montori, V.M. (2008) Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 3266–3281.

- [103] Milliez, P., Girerd, X., Plouin, P.-F., Blacher, J., Safar, M.E. and Mourad, J.-J. (2005) Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol* 45, 1243–1248.
- [104] Lifton, R.P., Dluhy, R.G., Powers, M., Rich, G.M., Cook, S., Ulick, S. and Lalouel, J.M. (1992) A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* 355, 262–265.
- [105] So, A., Duffy, D.L., Gordon, R.D., Jeske, Yvette W A, Lin-Su, K., New, M.I. and Stowasser, M. (2005) Familial hyperaldosteronism type II is linked to the chromosome 7p22 region but also shows predicted heterogeneity. *J Hypertens* 23, 1477–1484.
- [106] Sukor, N., Mulatero, P., Gordon, R.D., So, A., Duffy, D., Bertello, C., Kelemen, L., Jeske, Y., Veglio, F. and Stowasser, M. (2008) Further evidence for linkage of familial hyperaldosteronism type II at chromosome 7p22 in Italian as well as Australian and South American families. *J Hypertens* 26, 1577–1582.
- [107] Geller, D.S., Zhang, J., Wisgerhof, M.V., Shackleton, C., Kashgarian, M. and Lifton, R.P. (2008) A novel form of human mendelian hypertension featuring nonglucocorticoid-remediable aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 3117–3123.
- [108] Choi, M., Scholl, U.I., Yue, P., Bjorklund, P., Zhao, B., Nelson-Williams, C., Ji, W., Cho, Y., Patel, A., Men, C.J., Lolis, E., Wisgerhof, M.V., Geller, D.S., Mane, S., Hellman, P., Westin, G., Akerstrom, G., Wang, W., Carling, T. and Lifton, R.P. (2011) K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* 331, 768–772.
- [109] Robertson, P.W., Klidjian, A., Harding, L.K., Walters, G., Lee, M.R. and Robb-Smith, A.H. (1967) Hypertension due to a renin-secreting renal tumour. *Am J Med* 43, 963–976.
- [110] Kihara, I., Kitamura, S., Hoshino, T., Seida, H. and Watanabe, T. (1968) A hitherto unreported vascular tumor of the kidney: a proposal of "juxtaglomerular cell tumor". *Acta Pathol Jpn* 18, 197–206.
- [111] Miller, W.L. and Auchus, R.J. (2011) The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 32, 81–151.
- [112] Furgeson, S.B. and Linas, S. (2010) Mechanisms of type I and type II pseudohypoaldosteronism. *J Am Soc Nephrol* 21, 1842–1845.
- [113] Clark, A.J., Balla, T., Jones, M.R. and Catt, K.J. (1992) Stimulation of early gene expression by angiotensin II in bovine adrenal glomerulosa cells: roles of calcium and protein kinase C. *Mol Endocrinol* 6, 1889–1898.
- [114] Muller, J. (1998) Regulation of aldosterone biosynthesis: the end of the road? *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 25, S79–85.
- [115] Arakane, F., King, S.R., Du, Y., Kallen, C.B., Walsh, L.P., Watari, H., Stocco, D.M. and Strauss, J F 3rd (1997) Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J Biol Chem* 272, 32656–32662.
- [116] Cherradi, N., Brandenburger, Y. and Capponi, A.M. (1998) Mitochondrial regulation of mineralocorticoid biosynthesis by calcium and the StAR protein. *Eur J Endocrinol* 139, 249–256.
- [117] Fleury, A., Mathieu, A.P., Ducharme, L., Hales, D.B. and LeHoux, J.-G. (2004) Phosphorylation and function of the hamster adrenal steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Steroid Biochem Mol Biol* 91, 259–271.
- [118] Manna, P.R., Huhtaniemi, I.T. and Stocco, D.M. (2009) Mechanisms of protein kinase C signaling in the modulation of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated steroidogenesis in mouse gonadal cells. *Endocrinology* 150, 3308–3317.
- [119] Bassett, M.H., White, P.C. and Rainey, W.E. (2004) The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 217, 67–74. doi:10.1016/j.mce.2003.10.011.
- [120] Barrett, P.Q., Bollag, W.B., Isales, C.M., McCarthy, R.T. and Rasmussen, H. (1989) Role of calcium in angiotensin II-mediated aldosterone secretion. *Endocr Rev* 10, 496–518.
- [121] Bird, I.M., Hanley, N.A., Word, R.A., Mathis, J.M., McCarthy, J.L., Mason, J.I. and Rainey, W.E. (1993) Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion. *Endocrinology* 133, 1555–1561.
- [122] Bollag, W.B., Barrett, P.Q., Isales, C.M. and Rasmussen, H. (1991) Angiotensin-II-induced changes in diacylglycerol levels and their potential role in modulating the steroidogenic response. *Endocrinology* 128, 231–241.
- [123] Farese, R.V., Larson, R.E., Sabir, M.A. and Gomez-Sanchez, C. (1981) Effects of angiotensin-II and potassium on phospholipid metabolism in the adrenal zona glomerulosa. *J Biol Chem* 256, 11093–11097.
- [124] Ganguly, A. and Davis, J.S. (1994) Role of calcium and other mediators in aldosterone secretion from the adrenal glomerulosa cells. *Pharmacol Rev* 46, 417–447.
- [125] Hunyady, L., Baukal, A.J., Bor, M., Ely, J.A. and Catt, K.J. (1990) Regulation of 1,2-diacylglycerol production by angiotensin-II in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 126, 1001–1008.
- [126] Kojima, I., Kojima, K., Kreutter, D. and Rasmussen, H. (1984) The temporal integration of the aldosterone secretory response to angiotensin occurs via two intracellular pathways. *J Biol Chem* 259, 14448–14457.
- [127] Neves, S.R., Ram, P.T. and Iyengar, R. (2002) G protein pathways. *Science* 296, 1636–1639.

- [128] Matsunaga, H., Maruyama, Y., Kojima, I. and Hoshi, T. (1987) Transient Ca^{2+} -channel current characterized by a low-threshold voltage in zona glomerulosa cells of rat adrenal cortex. *Pflügers Arch* 408, 351–355.
- [129] Durroux, T., Gallo-Payet, N. and Payet, M.D. (1988) Three components of the calcium current in cultured glomerulosa cells from rat adrenal gland. *J Physiol* 404, 713–729.
- [130] Cohen, C.J., McCarthy, R.T., Barrett, P.Q. and Rasmussen, H. (1988) Ca^{2+} channels in adrenal glomerulosa cells: K^{+} and angiotensin II increase T-type Ca^{2+} channel current. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2412–2416.
- [131] Payet, M.D., Durroux, T., Bilodeau, L., Guillon, G. and Gallo-Payet, N. (1994) Characterization of K^{+} and Ca^{2+} ionic currents in glomerulosa cells from human adrenal glands. *Endocrinology* 134, 2589–2598.
- [132] Nowicky, M.C., Fox, A.P. and Tsien, R.W. (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316, 440–443.
- [133] Chen, X.L., Bayliss, D.A., Fern, R.J. and Barrett, P.Q. (1999) A role for T-type Ca^{2+} channels in the synergistic control of aldosterone production by ANG II and K^{+} . *Am J Physiol* 276, F674–83.
- [134] Quinn, S.J., Cornwall, M.C. and Williams, G.H. (1987) Electrical properties of isolated rat adrenal glomerulosa and fasciculata cells. *Endocrinology* 120, 903–914.
- [135] Lotshaw, D.P. (1997) Characterization of angiotensin II-regulated K^{+} conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *J Membr Biol* 156, 261–277.
- [136] Perez-Reyes, E. (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83, 117–161.
- [137] Czirjak, G. and Enyedi, P. (2002) TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol Endocrinol* 16, 621–629.
- [138] Lotshaw, D.P. (2006) Biophysical and pharmacological characteristics of native two-pore domain TASK channels in rat adrenal glomerulosa cells. *J Membr Biol* 210, 51–70.
- [139] Davies, L.A., Hu, C., Guagliardo, N.A., Sen, N., Chen, X., Talley, E.M., Carey, R.M., Bayliss, D.A. and Barrett, P.Q. (2008) TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2203–2208.
- [140] McCarthy, R.T., Isales, C. and Rasmussen, H. (1993) T-type calcium channels in adrenal glomerulosa cells: GTP-dependent modulation by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3260–3264.
- [141] Barrett, P.Q., Lu, H.K., Colbran, R., Czernik, A. and Pancrazio, J.J. (2000) Stimulation of unitary T-type Ca^{2+} channel currents by calmodulin-dependent protein kinase II. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 279, C1694–703.
- [142] Fern, R.J., Hahm, M.S., Lu, H.K., Liu, L.P., Gorelick, F.S. and Barrett, P.Q. (1995) Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II activation and regulation of adrenal glomerulosa Ca^{2+} signaling. *Am. J. Physiol.* 269, F751–60.
- [143] Lu, H.K., Fern, R.J., Nee, J.J. and Barrett, P.Q. (1994) Ca^{2+} -dependent activation of T-type Ca^{2+} channels by calmodulin-dependent protein kinase II. *Am. J. Physiol.* 267, F183–9.
- [144] Yao, J., Davies, L.A., Howard, J.D., Adney, S.K., Welsby, P.J., Howell, N., Carey, R.M., Colbran, R.J. and Barrett, P.Q. (2006) Molecular basis for the modulation of native T-type Ca^{2+} channels in vivo by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Clin. Invest.* 116, 2403–2412.
- [145] Lotshaw, D.P. (2001) Role of membrane depolarization and T-type Ca^{2+} channels in angiotensin II and K^{+} stimulated aldosterone secretion. *Mol Cell Endocrinol* 175, 157–171.
- [146] Hunyady, L., Rohacs, T., Bago, A., Deak, F. and Spat, A. (1994) Dihydropyridine-sensitive initial component of the ANG II-induced Ca^{2+} response in rat adrenal glomerulosa cells. *Am J Physiol* 266, C67–72.
- [147] Spat, A., Rohacs, T. and Hunyady, L. (1994) Plasmalemmal dihydropyridine receptors modify the function of subplasmalemmal inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: a hypothesis. *Cell Calcium* 15, 431–437.
- [148] Guagliardo, N.A., Yao, J., Hu, C. and Barrett, P.Q. (2012) Minireview: aldosterone biosynthesis: electrically gated for our protection. *Endocrinology* 153, 3579–3586.
- [149] Hu, C., Rusin, C.G., Tan, Z., Guagliardo, N.A. and Barrett, P.Q. (2012) Zona glomerulosa cells of the mouse adrenal cortex are intrinsic electrical oscillators. *J Clin Invest* 122, 2046–2053.
- [150] Condon, J.C., Pezzi, V., Drummond, B.M., Yin, S. and Rainey, W.E. (2002) Calmodulin-dependent kinase I regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase. *Endocrinology* 143, 3651–3657.
- [151] Manna, P.R., Eubank, D.W., Lalli, E., Sassone-Corsi, P. and Stocco, D.M. (2003) Transcriptional regulation of the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene by the cAMP response-element binding protein and steroidogenic factor 1. *J Mol Endocrinol* 30, 381–397.
- [152] Betancourt-Calle, S., Calle, R.A., Isales, C.M., White, S., Rasmussen, H. and Bollag, W.B. (2001) Differential effects of agonists of aldosterone secretion on steroidogenic acute regulatory phosphorylation. *Mol Cell Endocrinol* 173, 87–94.
- [153] Manna, P.R., Soh, J.-W. and Stocco, D.M. (2011) The involvement of specific PKC isoenzymes in phorbol ester-mediated regulation of steroidogenic acute regulatory protein expression and steroid synthesis in mouse Leydig cells. *Endocrinology* 152, 313–325.

- [154] Bird, I.M., Pasquarrette, M.M., Rainey, W.E. and Mason, J.I. (1996) Differential control of 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human adrenocortical H295R cells. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 2171–2178.
- [155] McEwan, P.E., Vinson, G.P. and Kenyon, C.J. (1999) Control of adrenal cell proliferation by AT1 receptors in response to angiotensin II and low-sodium diet. *Am J Physiol* 276, E303–9.
- [156] Hajnoczky, G., Csordas, G., Hunyady, L., Kalapos, M.P., Balla, T., Enyedi, P. and Spat, A. (1992) Angiotensin-II inhibits Na⁺/K⁺ pump in rat adrenal glomerulosa cells: possible contribution to stimulation of aldosterone production. *Endocrinology* 130, 1637–1644.
- [157] Pilon, A., Martin, G., Bultel-Brienne, S., Junquero, D., Delhon, A., Fruchart, J.-C., Staels, B. and Clavey, V. (2003) Regulation of the scavenger receptor BI and the LDL receptor by activators of aldosterone production, angiotensin II and PMA, in the human NCI-H295R adrenocortical cell line. *Biochim Biophys Acta* 1631, 218–228.
- [158] Liang, F., Kapoun, A.M., Lam, A., Damm, D.L., Quan, D., O'Connell, M. and Protter, A.A. (2007) B-Type natriuretic peptide inhibited angiotensin II-stimulated cholesterol biosynthesis, cholesterol transfer, and steroidogenesis in primary human adrenocortical cells. *Endocrinology* 148, 3722–3729.
- [159] Tian, Y., Balla, T., Baukal, A.J. and Catt, K.J. (1995) Growth responses to angiotensin II in bovine adrenal glomerulosa cells. *Am J Physiol* 268, E135–44.
- [160] Tian, Y., Smith, R.D., Balla, T. and Catt, K.J. (1998) Angiotensin II activates mitogen-activated protein kinase via protein kinase C and Ras/Raf-1 kinase in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 139, 1801–1809.
- [161] Varnai, P., Petheo, G.L., Makara, J.K. and Spat, A. (1998) Electrophysiological study on the high K⁺ sensitivity of rat glomerulosa cells. *Pflugers Arch* 435, 429–431.
- [162] Pralong, W.F., Hunyady, L., Varnai, P., Wollheim, C.B. and Spat, A. (1992) Pyridine nucleotide redox state parallels production of aldosterone in potassium-stimulated adrenal glomerulosa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 132–136.
- [163] Hunyady, L., Kayser, S., Cragoe, E J Jr, Balla, I., Balla, T. and Spat, A. (1988) Na⁺-H⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange in glomerulosa cells: possible role in control of aldosterone production. *Am J Physiol* 254, C744–50.
- [164] Kojima, I. and Ogata, E. (1989) Na-Ca exchanger as a calcium influx pathway in adrenal glomerulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 158, 1005–1012.
- [165] Carafoli, E. (1991) Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol Rev* 71, 129–153.
- [166] MacLennan, D.H., Rice, W.J. and Green, N.M. (1997) The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *J Biol Chem* 272, 28815–28818.
- [167] Bassett, M.H., Suzuki, T., Sasano, H., White, P.C. and Rainey, W.E. (2004) The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIIB regulate adrenal aldosterone production. *Mol Endocrinol* 18, 279–290.
- [168] Bassett, M.H., Zhang, Y., White, P.C. and Rainey, W.E. (2000) Regulation of human CYP11B2 and CYP11B1: comparing the role of the common CRE/Ad1 element. *Endocr Res* 26, 941–951.
- [169] Clyne, C.D., Zhang, Y., Slutsker, L., Mathis, J.M., White, P.C. and Rainey, W.E. (1997) Angiotensin II and potassium regulate human CYP11B2 transcription through common cis-elements. *Mol Endocrinol* 11, 638–649.
- [170] Nogueira, E.F. and Rainey, W.E. (2010) Regulation of aldosterone synthase by activator transcription factor/cAMP response element-binding protein family members. *Endocrinology* 151, 1060–1070.
- [171] Romero, D.G., Gomez-Sanchez, E.P. and Gomez-Sanchez, C.E. (2010) Angiotensin II-regulated transcription regulatory genes in adrenal steroidogenesis. *Physiol Genomics* 42A, 259–266.
- [172] Szekeres, M., Nadasy, G.L., Turu, G., Supeki, K., Szidonya, L., Buday, L., Chaplin, T., Clark, Adrian J L and Hunyady, L. (2010) Angiotensin II-induced expression of brain-derived neurotrophic factor in human and rat adrenocortical cells. *Endocrinology* 151, 1695–1703.
- [173] Bassett, M.H., Zhang, Y., Clyne, C., White, P.C. and Rainey, W.E. (2002) Differential regulation of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. *J Mol Endocrinol* 28, 125–135.
- [174] Ye, P., Nakamura, Y., Lalli, E. and Rainey, W.E. (2009) Differential effects of high and low steroidogenic factor-1 expression on CYP11B2 expression and aldosterone production in adrenocortical cells. *Endocrinology* 150, 1303–1309.
- [175] Cherradi, N., Pardo, B., Greenberg, A.S., Kraemer, F.B. and Capponi, A.M. (2003) Angiotensin II activates cholesterol ester hydrolase in bovine adrenal glomerulosa cells through phosphorylation mediated by p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 144, 4905–4915.
- [176] Cherradi, N., Rossier, M.F., Vallotton, M.B. and Capponi, A.M. (1996) Calcium stimulates intramitochondrial cholesterol transfer in bovine adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem* 271, 25971–25975.
- [177] Cherradi, N., Rossier, M.F., Vallotton, M.B., Timberg, R., Friedberg, I., Orly, J., Wang, X.J., Stocco, D.M. and Capponi, A.M. (1997) Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome p450_{scc} and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem* 272, 7899–7907.
- [178] Clark, B.J., Pezzi, V., Stocco, D.M. and Rainey, W.E. (1995) The steroidogenic acute regulatory protein is induced by angiotensin II and K⁺ in H295R adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol* 115, 215–219.

- [179] Rossier, M.F., Burnay, M.M., Brandenburger, Y., Cherradi, N., Vallotton, M.B. and Capponi, A.M. (1996) Sources and sites of action of calcium in the regulation of aldosterone biosynthesis. *Endocr Res* 22, 579–588.
- [180] Wiederkehr, A., Szanda, G., Akhmedov, D., Matak, C., Heizmann, C.W., Schoonjans, K., Pozzan, T., Spat, A. and Wollheim, C.B. (2011) Mitochondrial matrix calcium is an activating signal for hormone secretion. *Cell Metab* 13, 601–611.
- [181] Brauneis, U., Vassilev, P.M., Quinn, S.J., Williams, G.H. and Tillotson, D.L. (1991) ANG II blocks potassium currents in zona glomerulosa cells from rat, bovine, and human adrenals. *Am J Physiol* 260, E772–9.
- [182] Payet, M.D., Benabderrazik, M. and Gallo-Payet, N. (1987) Excitation-secretion coupling: ionic currents in glomerulosa cells: effects of adrenocorticotropin and K⁺ channel blockers. *Endocrinology* 121, 875–882.
- [183] Czirjak, G., Fischer, T., Spat, A., Lesage, F. and Enyedi, P. (2000) TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol Endocrinol* 14, 863–874.
- [184] Lesage, F. and Lazdunski, M. (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F793–801.
- [185] Enyeart, J.A., Danthi, S.J. and Enyeart, J.J. (2004) TREK-1 K⁺ channels couple angiotensin II receptors to membrane depolarization and aldosterone secretion in bovine adrenal glomerulosa cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E1154–65.
- [186] Bandulik, S., Penton, D., Barhanin, J. and Warth, R. (2010) TASK1 and TASK3 Potassium Channels: Determinants of Aldosterone Secretion and Adrenocortical Zonation. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. doi:10.1055/s-0029-1243601.
- [187] Heizmann, D., Derand, R., Jungbauer, S., Bandulik, S., Sterner, C., Schweda, F., El Wakil, A., Lalli, E., Guy, N., Mengual, R., Reichold, M., Tegtmeier, I., Bendahhou, S., Gomez-Sanchez, C.E., Aller, M.I., Wisden, W., Weber, A., Lesage, F., Warth, R. and Barhanin, J. (2008) Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. *EMBO J* 27, 179–187. doi:10.1038/sj.emboj.7601934.
- [188] Bayliss, D.A., Sirois, J.E. and Talley, E.M. (2003) The TASK family: two-pore domain background K⁺ channels. *Mol Interv* 3, 205–219.
- [189] Czirjak, G. and Enyedi, P. (2002) Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J Biol Chem* 277, 5426–5432.
- [190] Penton, D., Bandulik, S., Schweda, F., Haubs, S., Tauber, P., Reichold, M., Cong, L.D., El Wakil, A., Budde, T., Lesage, F., Lalli, E., Zennaro, M.-C., Warth, R. and Barhanin, J. (2012) Task3 potassium channel gene invalidation causes low renin and salt-sensitive arterial hypertension. *Endocrinology* 153, 4740–4748.
- [191] Guagliardo, N.A., Yao, J., Hu, C., Schertz, E.M., Tyson, D.A., Carey, R.M., Bayliss, D.A. and Barrett, P.Q. (2012) TASK-3 channel deletion in mice recapitulates low-renin essential hypertension. *Hypertension* 59, 999–1005.
- [192] Enyeart, J.J. and Enyeart, J.A. (2013) Ca²⁺ and K⁺ channels of normal human adrenal zona fasciculata cells: Properties and modulation by ACTH and AngII. *J Gen Physiol* 142, 137–155.
- [193] Enyeart, J.J., Liu, H. and Enyeart, J.A. (2011) Calcium-dependent inhibition of adrenal TREK-1 channels by angiotensin II and ionomycin. *Am J Physiol Cell Physiol* 301, C619–29.
- [194] Liu, H., Enyeart, J.A. and Enyeart, J.J. (2007) Angiotensin II inhibits native bTREK-1 K⁺ channels through a PLC-, kinase C-, and PIP2-independent pathway requiring ATP hydrolysis. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C682–95.
- [195] Liu, H., Enyeart, J.A. and Enyeart, J.J. (2008) ACTH inhibits bTREK-1 K⁺ channels through multiple cAMP-dependent signaling pathways. *J Gen Physiol* 132, 279–294.
- [196] Enyeart, J.J., Xu, L., Danthi, S. and Enyeart, J.A. (2002) An ACTH- and ATP-regulated background K⁺ channel in adrenocortical cells is TREK-1. *J Biol Chem* 277, 49186–49199.
- [197] Kanazirska, M.V., Vassilev, P.M., Quinn, S.J., Tillotson, D.L. and Williams, G.H. (1992) Single K⁺ channels in adrenal zona glomerulosa cells. II. Inhibition by angiotensin II. *Am J Physiol* 263, E760–5.
- [198] Vassilev, P.M., Kanazirska, M.V., Quinn, S.J., Tillotson, D.L. and Williams, G.H. (1992) K⁺ channels in adrenal zona glomerulosa cells. I. Characterization of distinct channel types. *Am J Physiol* 263, E752–9.
- [199] Arrighi, I., Bloch-Faure, M., Grahmmer, F., Bleich, M., Warth, R., Mengual, R., Drici, M.D., Barhanin, J. and Meneton, P. (2001) Altered potassium balance and aldosterone secretion in a mouse model of human congenital long QT syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8792–8797. doi:10.1073/pnas.141233398.
- [200] Sarzani, R., Pietrucci, F., Francioni, M., Salvi, F., Letizia, C., D'Erasmo, E., Dessi Fulgheri, P. and Rappelli, A. (2006) Expression of potassium channel isoforms mRNA in normal human adrenals and aldosterone-secreting adenomas. *J Endocrinol Invest* 29, 147–153.
- [201] Sausbier, M., Arntz, C., Bucurenciu, I., Zhao, H., Zhou, X.-B., Sausbier, U., Feil, S., Kamm, S., Essin, K., Sailer, C.A., Abdullah, U., Krippeit-Drews, P., Feil, R., Hofmann, F., Knaus, H.-G., Kenyon, C., Shipston, M.J., Storm, J.F., Neuhuber, W., Korth, M., Schubert, R., Gollasch, M. and Ruth, P. (2005) Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation* 112, 60–68.
- [202] Grimm, P.R., Isirli, D.L., Settles, D.C., Holtzclaw, J.D. and Sansom, S.C. (2009) Hypertension of *Kcnmb1*^{-/-} is linked to deficient K secretion and aldosteronism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11800–11805.

- [203] Ganz, M.B., Nee, J.J., Isales, C.M. and Barrett, P.Q. (1994) Atrial natriuretic peptide enhances activity of potassium conductance in adrenal glomerulosa cells. *Am J Physiol* 266, C1357-65.
- [204] Xu, H., Garver, H., Galligan, J.J. and Fink, G.D. (2011) Large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel $\beta 1$ -subunit knockout mice are not hypertensive. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300, H476-85.
- [205] Spät, A. and Hunyady, L. (2004) Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol. Rev.* 84, 489–539. doi:10.1152/physrev.00030.2003.
- [206] Nogueira, E.F., Gerry, D., Mantero, F., Mariniello, B. and Rainey, W.E. (2010) The role of TASK1 in aldosterone production and its expression in normal adrenal and aldosterone-producing adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 73, 22–29.
- [207] Bandulik, S. (2010) Untersuchungen zur Bedeutung der 2-P-Domänen-Kaliumkanäle TASK1 und TASK3 für die Funktion der Nebenniere.
- [208] Bandulik, S., Tauber, P., Penton, D., Schweda, F., Tegtmeyer, I., Sterner, C., Lalli, E., Lesage, F., Hartmann, M., Barhanin, J. and Warth, R. (2013) Severe hyperaldosteronism in neonatal Task3 potassium channel knockout mice is associated with activation of the intraadrenal renin-angiotensin system. *Endocrinology* 154, 2712–2722.
- [209] Jung, J., Barrett, P.Q., Eckert, G.J., Edenberg, H.J., Xuei, X., Tu, W. and Pratt, J.H. (2012) Variations in the potassium channel genes *KCNK3* and *KCNK9* in relation to blood pressure and aldosterone production: an exploratory study. *J Clin Endocrinol Metab* 97, E2160-7.
- [210] Mulatero, P., Tauber, P., Zennaro, M.-C., Monticone, S., Lang, K., Beuschlein, F., Fischer, E., Tizzani, D., Pallauf, A., Viola, A., Amar, L., Williams, T.A., Strom, T.M., Graf, E., Bandulik, S., Penton, D., Plouin, P.-F., Warth, R., Allolio, B., Jeunemaitre, X., Veglio, F. and Reincke, M. (2012) *KCNJ5* mutations in European families with nonglucocorticoid remediable familial hyperaldosteronism. *Hypertension* 59, 235–240.
- [211] Azizan, Elena A B, Murthy, M., Stowasser, M., Gordon, R., Kowalski, B., Xu, S., Brown, M.J. and O'Shaughnessy, K.M. (2012) Somatic mutations affecting the selectivity filter of *KCNJ5* are frequent in 2 large unselected collections of adrenal aldosteronomas. *Hypertension* 59, 587–591.
- [212] Akerstrom, T., Crona, J., Delgado Verdugo, A., Starker, L.F., Cupisti, K., Willenberg, H.S., Knoefel, W.T., Saeger, W., Feller, A., Ip, J., Soon, P., Anlauf, M., Alesina, P.F., Schmid, K.W., Decaussin, M., Levillain, P., Wangberg, B., Peix, J.-L., Robinson, B., Zedenius, J., Backdahl, M., Caramuta, S., Iwen, K.A., Botling, J., Stalberg, P., Kraimps, J.-L., Dralle, H., Hellman, P., Sidhu, S., Westin, G., Lehnert, H., Walz, M.K., Akerstrom, G., Carling, T., Choi, M., Lifton, R.P. and Bjorklund, P. (2012) Comprehensive re-sequencing of adrenal aldosterone producing lesions reveal three somatic mutations near the *KCNJ5* potassium channel selectivity filter. *PLoS One* 7, e41926.
- [213] Azizan, Elena A B, Poulsen, H., Tuluc, P., Zhou, J., Clausen, M.V., Lieb, A., Maniero, C., Garg, S., Bochukova, E.G., Zhao, W., Shaikh, L.H., Brighton, C.A., Teo, Ada E D, Davenport, A.P., Dekkers, T., Tops, B., Kusters, B., Ceral, J., Yeo, Giles S H, Neogi, S.G., McFarlane, I., Rosenfeld, N., Marass, F., Hadfield, J., Margas, W., Chaggar, K., Solar, M., Deinum, J., Dolphin, A.C., Farooqi, I.S., Striessnig, J., Nissen, P. and Brown, M.J. (2013) Somatic mutations in *ATP1A1* and *CACNA1D* underlie a common subtype of adrenal hypertension. *Nat Genet* 45, 1055–1060.
- [214] Scholl, U.I., Nelson-Williams, C., Yue, P., Grekin, R., Wyatt, R.J., Dillon, M.J., Couch, R., Hammer, L.K., Harley, F.L., Farhi, A., Wang, W.-H. and Lifton, R.P. (2012) Hypertension with or without adrenal hyperplasia due to different inherited mutations in the potassium channel *KCNJ5*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2533–2538.
- [215] Charmandari, E., Sertedaki, A., Kino, T., Merakou, C., Hoffman, D.A., Hatch, M.M., Hurt, D.E., Lin, L., Xekouki, P., Stratakis, C.A. and Chrousos, G.P. (2012) A novel point mutation in the *KCNJ5* gene causing primary hyperaldosteronism and early-onset autosomal dominant hypertension. *J Clin Endocrinol Metab* 97, E1532-9.
- [216] Monticone, S., Hattangady, N.G., Penton, D., Isales, C., Edwards, M.A., Williams, T.A., Sterner, C., Warth, R., Mulatero, P. and Rainey, W.E. (2013) A novel Y152C *KCNJ5* mutation responsible for familial hyperaldosteronism type III. *J Clin Endocrinol Metab*.
- [217] Boulkroun, S., Beuschlein, F., Rossi, G.-P., Golib-Dzib, J.-F., Fischer, E., Amar, L., Mulatero, P., Samson-Couterie, B., Hahner, S., Quinkler, M., Fallo, F., Letizia, C., Allolio, B., Ceolotto, G., Cicala, M.V., Lang, K., Lefebvre, H., Lenzini, L., Maniero, C., Monticone, S., Perrocheau, M., Pilon, C., Plouin, P.-F., Rayes, N., Seccia, T.M., Veglio, F., Williams, T.A., Zinnamosca, L., Mantero, F., Benecke, A., Jeunemaitre, X., Reincke, M. and Zennaro, M.-C. (2012) Prevalence, clinical, and molecular correlates of *KCNJ5* mutations in primary aldosteronism. *Hypertension* 59, 592–598.
- [218] Xekouki, P., Hatch, M.M., Lin, L., Rodrigo, D.A., Azevedo, M., de la Luz Sierra, Maria, Levy, I., Saloustros, E., Moraitis, A., Horvath, A., Kebebew, E., Hoffman, D.A. and Stratakis, C.A. (2012) *KCNJ5* mutations in the National Institutes of Health cohort of patients with primary hyperaldosteronism: an infrequent genetic cause of Conn's syndrome. *Endocr Relat Cancer* 19, 255–260.
- [219] Monticone, S., Hattangady, N.G., Nishimoto, K., Mantero, F., Rubin, B., Cicala, M.V., Pezzani, R., Auchus, R.J., Ghayee, H.K., Shibata, H., Kurihara, I., Williams, T.A., Giri, J.G., Bollag, R.J., Edwards, M.A., Isales, C.M. and Rainey, W.E. (2012) Effect of *KCNJ5* mutations on gene expression in aldosterone-producing adenomas and adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 97, E1567-72.
- [220] Azizan, Elena A B, Lam, Brian Y H, Newhouse, S.J., Zhou, J., Kuc, R.E., Clarke, J., Happerfield, L., Marker, A., Hoffman, G.J. and Brown, M.J. (2012) Microarray, qPCR, and *KCNJ5* sequencing of aldosterone-producing adenomas reveal differences in genotype and phenotype between zona glomerulosa- and zona fasciculata-like tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 97, E819-29.

- [221] Taguchi, R., Yamada, M., Nakajima, Y., Satoh, T., Hashimoto, K., Shibusawa, N., Ozawa, A., Okada, S., Rokutanda, N., Takata, D., Koibuchi, Y., Horiguchi, J., Oyama, T., Takeyoshi, I. and Mori, M. (2012) Expression and mutations of KCNJ5 mRNA in Japanese patients with aldosterone-producing adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 97, 1311–1319.
- [222] Krapivinsky, G., Gordon, E.A., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L. and Clapham, D.E. (1995) The G-protein-gated atrial K⁺ channel IK_{ACh} is a heteromultimer of two inwardly rectifying K⁺-channel proteins. *Nature* 374, 135–141.
- [223] Spauschus, A., Lentes, K.U., Wischmeyer, E., Dissmann, E., Karschin, C. and Karschin, A. (1996) A G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel (GIRK4) from human hippocampus associates with other GIRK channels. *J Neurosci* 16, 930–938.
- [224] Gregerson, K.A., Flagg, T.P., O'Neill, T.J., Anderson, M., Luring, O., Horel, J.S. and Welling, P.A. (2001) Identification of G protein-coupled, inward rectifier potassium channel gene products from the rat anterior pituitary gland. *Endocrinology* 142, 2820–2832.
- [225] Mintert, E., Bosche, L.I., Rinne, A., Timpert, M., Kienitz, M.-C., Pott, L. and Bender, K. (2007) Generation of a constitutive Na⁺-dependent inward-rectifier current in rat adult atrial myocytes by overexpression of Kir3.4. *J Physiol* 585, 3–13.
- [226] Yang, Y., Yang, Y., Liang, B., Liu, J., Li, J., Grunnet, M., Olesen, S.-P., Rasmussen, H.B., Ellinor, P.T., Gao, L., Lin, X., Li, L., Wang, L., Xiao, J., Liu, Y., Liu, Y., Zhang, S., Liang, D., Peng, L., Jespersen, T. and Chen, Y.-H. (2010) Identification of a Kir3.4 mutation in congenital long QT syndrome. *Am J Hum Genet* 86, 872–880.
- [227] Wickman, K., Nemec, J., Gendler, S.J. and Clapham, D.E. (1998) Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron* 20, 103–114.
- [228] Perry, C.A., Pravetoni, M., Teske, J.A., Aguado, C., Erickson, D.J., Medrano, J.F., Lujan, R., Kotz, C.M. and Wickman, K. (2008) Predisposition to late-onset obesity in GIRK4 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8148–8153.
- [229] Oki, K., Plonczynski, M.W., Luis Lam, M., Gomez-Sanchez, E.P. and Gomez-Sanchez, C.E. (2012) Potassium channel mutant KCNJ5 T158A expression in HAC-15 cells increases aldosterone synthesis. *Endocrinology* 153, 1774–1782.
- [230] Guyon, A., Tardy, M.P., Rovere, C., Nahon, J.-L., Barhanin, J. and Lesage, F. (2009) Glucose inhibition persists in hypothalamic neurons lacking tandem-pore K⁺ channels. *J Neurosci* 29, 2528–2533.
- [231] Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U. and Speed, T.P. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249–264.
- [232] Fink, M., Lesage, F., Duprat, F., Heurteaux, C., Reyes, R., Fosset, M. and Lazdunski, M. (1998) A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* 17, 3297–3308.
- [233] Romero, D.G., Yanes, L.L., de Rodriguez, Angela F., Plonczynski, M.W., Welsh, B.L., Reckelhoff, J.F., Gomez-Sanchez, E.P. and Gomez-Sanchez, C.E. (2007) Disabled-2 is expressed in adrenal zona glomerulosa and is involved in aldosterone secretion. *Endocrinology* 148, 2644–2652.
- [234] Dalle, M., Giry, J., Gay, M. and Delost, P. (1978) Perinatal changes in plasma and adrenal corticosterone and aldosterone concentrations in the mouse. *J Endocrinol* 76, 303–309.
- [235] Romero, D.G., Plonczynski, M., Vergara, G.R., Gomez-Sanchez, E.P. and Gomez-Sanchez, C.E. (2004) Angiotensin II early regulated genes in H295R human adrenocortical cells. *Physiol Genomics* 19, 106–116.
- [236] Kodama, S. and Negishi, M. (2011) Pregnane X receptor PXR activates the GADD45beta gene, eliciting the p38 MAPK signal and cell migration. *J Biol Chem* 286, 3570–3578.
- [237] Andreis, P.G., Malendowicz, L.K., Rebuffat, P., Spinazzi, R., Ziolkowska, A. and Nussdorfer, G.G. (2007) Galanin enhances corticosterone secretion from dispersed rat adrenocortical cells through the activation of GAL-R1 and GAL-R2 receptors coupled to the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *Int J Mol Med* 19, 149–155.
- [238] Belloni, A.S., Malendowicz, L.K., Rucinski, M., Guidolin, D. and Nussdorfer, G.G. (2007) Galanin stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through the activation of galanin receptor subtype 1 coupled to the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *Int J Mol Med* 20, 859–864.
- [239] Bauer, F.E., Hacker, G.W., Terenghi, G., Adrian, T.E., Polak, J.M. and Bloom, S.R. (1986) Localization and molecular forms of galanin in human adrenals: elevated levels in pheochromocytomas. *J Clin Endocrinol Metab* 63, 1372–1378.
- [240] Malendowicz, L.K., Nussdorfer, G.G., Nowak, K.W. and Mazzocchi, G. (1994) The possible involvement of galanin in the modulation of the function of rat pituitary-adrenocortical axis under basal and stressful conditions. *Endocr Res* 20, 307–317.
- [241] Mazzocchi, G., Malendowicz, L.K., Rebuffat, P. and Nussdorfer, G.G. (1992) Effects of galanin on the secretory activity of the rat adrenal cortex: in vivo and in vitro studies. *Res Exp Med (Berl)* 192, 373–381.
- [242] Whitworth, E.J., Kosti, O., Renshaw, D. and Hinson, J.P. (2003) Adrenal neuropeptides: regulation and interaction with ACTH and other adrenal regulators. *Microsc Res Tech* 61, 259–267.
- [243] Neri, G., Andreis, P.G. and Nussdorfer, G.G. (1990) Effects of neuropeptide-Y and substance-P on the secretory activity of dispersed zona-glomerulosa cells of rat adrenal gland. *Neuropeptides* 17, 121–125.

- [244] Nussdorfer, G.G. and Malendowicz, L.K. (1998) Role of tachykinins in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides* 19, 949–968.
- [245] Beuschlein, F., Looyenga, B.D., Bleasdale, S.E., Mutch, C., Bavers, D.L., Parlow, A.F., Nilson, J.H. and Hammer, G.D. (2003) Activin induces x-zone apoptosis that inhibits luteinizing hormone-dependent adrenocortical tumor formation in inhibin-deficient mice. *Mol Cell Biol* 23, 3951–3964.
- [246] Vanttinen, T., Liu, J., Kuulasmaa, T., Kivinen, P. and Voutilainen, R. (2003) Expression of activin/inhibin signaling components in the human adrenal gland and the effects of activins and inhibins on adrenocortical steroidogenesis and apoptosis. *J Endocrinol* 178, 479–489.
- [247] Spat, A., Fulop, L. and Szanda, G. (2012) The role of mitochondrial Ca²⁺ and NAD(P)H in the control of aldosterone secretion. *Cell Calcium* 52, 64–72.
- [248] Meimaridou, E., Kowalczyk, J., Guasti, L., Hughes, C.R., Wagner, F., Frommolt, P., Nurnberg, P., Mann, N.P., Banerjee, R., Saka, H.N., Chapple, J.P., King, P.J., Clark, Adrian J L and Metherell, L.A. (2012) Mutations in NNT encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase cause familial glucocorticoid deficiency. *Nat Genet* 44, 740–742.
- [249] Liao, Y., Plummer, N.W., George, M.D., Abramowitz, J., Zhu, M.X. and Birnbaumer, L. (2009) A role for Orai in TRPC-mediated Ca²⁺ entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca²⁺ entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3202–3206.
- [250] Hong, C., Kim, J., Jeon, J.-P., Wie, J., Kwak, M., Ha, K., Kim, H., Myeong, J., Kim, S.Y., Jeon, J.-H. and So, I. (2012) Gs cascade regulates canonical transient receptor potential 5 (TRPC5) through cAMP mediated intracellular Ca²⁺ release and ion channel trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 421, 105–111.
- [251] O'Carroll, A.-M. (2003) Localization of messenger ribonucleic acids for somatostatin receptor subtypes (sstr1-5) in the rat adrenal gland. *J Histochem Cytochem* 51, 55–60.
- [252] Ziegler, C.G., Brown, J.W., Schally, A.V., Erler, A., Gebauer, L., Treszl, A., Young, L., Fishman, L.M., Engel, J.B., Willenberg, H.S., Petersenn, S., Eisenhofer, G., Ehrhart-Bornstein, M. and Bornstein, S.R. (2009) Expression of neuropeptide hormone receptors in human adrenal tumors and cell lines: antiproliferative effects of peptide analogues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15879–15884.
- [253] El Wakil, A., Bandulik, S., Guy, N., Bendahhou, S., Zennaro, M.-C., Niehrs, C., Mari, B., Warth, R., Barhanin, J. and Lalli, E. (2012) Dkk3 is a component of the genetic circuitry regulating aldosterone biosynthesis in the adrenal cortex. *Hum Mol Genet* 21, 4922–4929.
- [254] Scholl, U.I. and Lifton, R.P. (2013) New insights into aldosterone-producing adenomas and hereditary aldosteronism: mutations in the K⁺ channel KCNJ5. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 22, 141–147.
- [255] Iwamoto, T., Watano, T. and Shigekawa, M. (1996) A novel isothiourea derivative selectively inhibits the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchange in cells expressing NCX1. *J Biol Chem* 271, 22391–22397.
- [256] Bergson, P., Lipkind, G., Lee, S.P., Duban, M.-E. and Hanck, D.A. (2011) Verapamil block of T-type calcium channels. *Mol Pharmacol* 79, 411–419.
- [257] Yu, F.H., Shull, G.E. and Orlowski, J. (1993) Functional properties of the rat Na/H exchanger NHE-2 isoform expressed in Na/H exchanger-deficient Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 268, 25536–25541.
- [258] Doi, M., Takahashi, Y., Komatsu, R., Yamazaki, F., Yamada, H., Haraguchi, S., Emoto, N., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Kanematsu, A., Ogawa, O., Todo, T., Tsutsui, K., van der Horst, Gijsbertus T J and Okamura, H. (2010) Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. *Nat Med* 16, 67–74.
- [259] Paul, M., Poyan Mehr, A. and Kreutz, R. (2006) Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86, 747–803.
- [260] Brecher, A.S., Shier, D.N., Dene, H., Wang, S.M., Rapp, J.P., Franco-Saenz, R. and Mulrow, P.J. (1989) Regulation of adrenal renin messenger ribonucleic acid by dietary sodium chloride. *Endocrinology* 124, 2907–2913.
- [261] Doi, Y., Atarashi, K., Franco-Saenz, R. and Mulrow, P.J. (1984) Effect of changes in sodium or potassium balance, and nephrectomy, on adrenal renin and aldosterone concentrations. *Hypertension* 6, 1124–9.
- [262] Naruse, M. and Inagami, T. (1982) Markedly elevated specific renin levels in the adrenal in genetically hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 3295–3299.
- [263] Aguilera, G., Schirar, A., Baukal, A. and Catt, K.J. (1981) Circulating angiotensin II and adrenal receptors after nephrectomy. *Nature* 289, 507–509.
- [264] Naruse, M., Sussman, C.R., Naruse, K., Jackson, R.V. and Inagami, T. (1983) Renin exists in human adrenal tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 57, 482–487.
- [265] Racz, K., Pinet, F., Gasc, J.M., Guyene, T.T. and Corvol, P. (1992) Coexpression of renin, angiotensinogen, and their messenger ribonucleic acids in adrenal tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 730–737.
- [266] Iimura, O., Shimamoto, K., Hotta, D., Nakata, T., Mito, T., Kumamoto, Y., Dempo, K., Ogihara, T. and Naruse, K. (1986) A case of adrenal tumor producing renin, aldosterone, and sex steroid hormones. *Hypertension* 8, 951–956.
- [267] Hilbers, U., Peters, J., Bornstein, S.R., Correa, F.M., Jöhren, O., Saavedra, J.M. and Ehrhart-Bornstein, M. (1999) Local renin-angiotensin system is involved in K⁺-induced aldosterone secretion from human adrenocortical NCI-H295 cells. *Hypertension* 33, 1025–1030.

- [268] Naruse, M., Naruse, K., Inagaki, T. and Inagami, T. (1984) Immunoreactive renin in mouse adrenal gland. Localization in the inner cortical region. *Hypertension* 6, 275–280.
- [269] Jones, C.A., Sigmund, C.D., McGowan, R.A., Kane-Haas, C.M. and Gross, K.W. (1990) Expression of murine renin genes during fetal development. *Mol Endocrinol* 4, 375–383.
- [270] Kon, Y., Hashimoto, Y., Kitagawa, H., Sugimura, M. and Murakami, K. (1990) Renin immunohistochemistry in the adrenal gland of the mouse fetus and neonate. *Anat Rec* 227, 124–131.
- [271] Peters, J. (2012) Local renin-angiotensin systems in the adrenal gland. *Peptides* 34, 427–432.
- [272] Kim, A.C. and Hammer, G.D. (2007) Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances. *Mol. Cell. Endocrinol.* 265–266, 10–16. doi:10.1016/j.mce.2006.12.028.
- [273] Beuschlein, F. (2013) Regulation of aldosterone secretion: from physiology to disease. *Eur J Endocrinol* 168, R85–93.
- [274] Murthy, M., Azizan, Elena A B, Brown, M.J. and O'Shaughnessy, K.M. (2012) Characterization of a novel somatic KCNJ5 mutation dell157 in an aldosterone-producing adenoma. *J Hypertens* 30, 1827–1833.
- [275] Williams, T.A., Monticone, S., Schack, V.R., Stindl, J., Burrello, J., Buffolo, F., Annaratone, L., Castellano, I., Beuschlein, F., Reincke, M., Lucatello, B., Ronconi, V., Fallo, F., Bernini, G., Maccario, M., Giacchetti, G., Veglio, F., Warth, R., Vilsen, B. and Mulatero, P. (2013) Somatic ATP1A1, ATP2B3, and KCNJ5 Mutations in Aldosterone-Producing Adenomas. *Hypertension*.
- [276] Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. and MacKinnon, R. (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J* 66, 1061–1067.
- [277] Roux, B. (2005) Ion conduction and selectivity in K⁽⁺⁾ channels. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 34, 153–171.
- [278] Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Heurteaux, C., Fosset, M., Romey, G., Barhanin, J. and Lazdunski, M. (1995) Molecular properties of neuronal G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *J Biol Chem* 270, 28660–28667.
- [279] Oki, K., Plonczynski, M.W., Lam, M.L., Gomez-Sanchez, E.P. and Gomez-Sanchez, C.E. (2012) The potassium channel, Kir3.4 participates in angiotensin II-stimulated aldosterone production by a human adrenocortical cell line. *Endocrinology* 153, 4328–4335.
- [280] Tong, Y., Wei, J., Zhang, S., Strong, J.A., Dlouhy, S.R., Hodes, M.E., Ghetti, B. and Yu, L. (1996) The weaver mutation changes the ion selectivity of the affected inwardly rectifying potassium channel GIRK2. *FEBS Lett* 390, 63–68.
- [281] Beuschlein, F., Boukroun, S., Osswald, A., Wieland, T., Nielsen, H.N., Lichtenauer, U.D., Penton, D., Schack, V.R., Amar, L., Fischer, E., Walther, A., Tauber, P., Schwarzmayer, T., Diener, S., Graf, E., Allolio, B., Samson-Couterie, B., Benecke, A., Quinkler, M., Fallo, F., Plouin, P.-F., Mantero, F., Meitinger, T., Mulatero, P., Jeunemaitre, X., Warth, R., Vilsen, B., Zennaro, M.-C., Strom, T.M. and Reincke, M. (2013) Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. *Nat Genet* 45, 440–4, 444e1–2.
- [282] Scholl, U.I., Goh, G., Stolting, G., de Oliveira, Regina Campos, Choi, M., Overton, J.D., Fonseca, A.L., Korah, R., Starker, L.F., Kunstman, J.W., Prasad, M.L., Hartung, E.A., Mauras, N., Benson, M.R., Brady, T., Shapiro, J.R., Loring, E., Nelson-Williams, C., Libutti, S.K., Mane, S., Hellman, P., Westin, G., Akerstrom, G., Bjorklund, P., Carling, T., Fahlke, C., Hidalgo, P. and Lifton, R.P. (2013) Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. *Nat Genet* 45, 1050–1054.
- [283] Allen, D.G., Cairns, S.P., Turvey, S.E. and Lee, J.A. (1993) Intracellular calcium and myocardial function during ischemia. *Adv Exp Med Biol* 346, 19–29.
- [284] Chen, S. and Li, S. (2012) The Na⁺/Ca²⁺ exchanger in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Med Sci Monit* 18, RA161–5.
- [285] Rahman, M., Inman, M., Kiss, L. and Janssen, L.J. (2012) Reverse-mode NCX current in mouse airway smooth muscle: Na⁽⁺⁾ and voltage dependence, contributions to Ca²⁺ influx and contraction, and altered expression in a model of allergen-induced hyperresponsiveness. *Acta Physiol (Oxf)* 205, 279–291.
- [286] Andrikopoulos, P., Baba, A., Matsuda, T., Djamgoz, Mustafa B A, Yaqoob, M.M. and Eccles, S.A. (2011) Ca²⁺ influx through reverse mode Na⁺/Ca²⁺ exchange is critical for vascular endothelial growth factor-mediated extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 activation and angiogenic functions of human endothelial cells. *J Biol Chem* 286, 37919–37931.
- [287] Cheng, H., Zhang, Y., Du, C., Dempsey, C.E. and Hancox, J.C. (2012) High potency inhibition of hERG potassium channels by the sodium-calcium exchange inhibitor KB-R7943. *Br J Pharmacol* 165, 2260–2273.
- [288] Arakawa, N., Sakaue, M., Yokoyama, I., Hashimoto, H., Koyama, Y., Baba, A. and Matsuda, T. (2000) KB-R7943 inhibits store-operated Ca²⁺ entry in cultured neurons and astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 354–357.
- [289] Abramochkin, D.V., Alekseeva, E.I. and Vornanen, M. (2013) Inhibition of the cardiac inward rectifier potassium currents by KB-R7943. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 158, 181–186.
- [290] Jin, W., Klem, A.M., Lewis, J.H. and Lu, Z. (1999) Mechanisms of inward-rectifier K⁺ channel inhibition by tertiapin-Q. *Biochemistry* 38, 14294–14301.

- [291] Jin, W. and Lu, Z. (1998) A novel high-affinity inhibitor for inward-rectifier K⁺ channels. *Biochemistry* 37, 13291–13299.
- [292] Guthrie, G P Jr, McAllister, R G Jr and Kotchen, T.A. (1983) Effects of intravenous and oral verapamil upon pressor and adrenal steroidogenic responses in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 57, 339–343.

7. Anhang

7.1 Arbeitsbezogene Daten

7.1.1 Primersequenzen für Real-time PCR

Alle Primersequenzen wurden von Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland) synthetisiert. Für Gene, die mit einem # gekennzeichnet sind, konnten keine intron-spanning Primer designet werden.

Gen	Spezies	Sense Primer	Anti-sense Primer
Actb (β-Aktin)	Maus	GACAGGATGCAGAAGGAGATTACTG	CCACCGATCCACACAGAGTACTT
Acvr1c	Maus	TGGGAAATAGCTCGAAGGTG	GTAAGGCAACTGGTACTCCTCAA
Cyp11b1 #	Maus	TGTATCGAGAGCTGGCAGAG	CCTGGATGGCATCCATTGAC
Cyp11b2	Maus	ACCTACAGTGGCATTGTG	GATTGCTGTCGTGTCAAC
Dkk3	Maus	TGATGGAAGACACTCAGCACA	CCAGGTTACCTCAGAGGAC
Fst	Maus	TGGATTAGCCTATGAGGGAAAG	TGGAATCCCATAGGCATTTT
Gadd45b	Maus	GGTATCAGGCATGCAGAGG	TGGCTTTTCCAGGAATCTGT
Gal	Maus	CTGGCTCCTGTTGGTTGTG	TGTTCAAGGTTCAACCTCTC
Hsd3b6	Maus	CATCCTTCCACAGTTCTAGC	TGGTGTGAGATTAATGTACA
Htr1b #	Maus	CTGACCTGCTCGTGTCCAT	TAGTGTCCAGCGTCCAGTGA
Nnt	Maus	CCTGGTGGCACCTTCGTA	CTGAGCCCAGGTACATGATTT
Nr4a2	Maus	TCAGAGCCCACGTCGATT	TAGTCAGGGTTTGCCTGGAA
Ren1	Maus	GGAGGAAGTGTTCTCTGTCTACTACA	GCTACCTCCTAGCACCACTC
Sstr2 #	Maus	TCTTTGCTTGGTCAAGGTGA	TCCTGCTTACTGTGCTCCT
Tac1	Maus	AAGCCTCAGCAGTTCTTTGG	TCTGGCCATGTCCATAAAGA
Trpc5	Maus	GCAATCAAATATCACCAGAAAGAG	GCCATCGTACCACAAGGTG
Actb (β-Aktin)	Human	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGGATAG
SLC8A1 (NCX1)	Human	CCAGACACATTTGCCAGC	GACATTCACCGCGTTGCT
SLC8A2 (NCX2)	Human	CATATGATTTTAAGAACACGGT	CCTCTAAAACTGCTCCCTC
SLC8A3 (NCX3)	Human	CCAGATACGTTTGCCAGC	TGCCCAGGAAGACATTGAC
SLC24A2 (NCKX2)	Human	ACGTTTCGAAACCTTCATCG	CCCACCAGACCATCAAGTAAG
SLC24A3 (NCKX3)	Human	GCTGTGGATTACGGATCCTAC	AACAGAGGCCAGGAGCAAG
SLC24A4 (NCKX4)	Human	GTGGCTGGTGAATATTATCG	GCAGTCTGGAACACTTGTC
SLC24A6 (NCKX6)	Human	ATGGGCTCTGGGTACCTG	TCTCCGTTGCCGTTGGTAG

7.1.2 Adrenales mRNA-Expressionsprofil von Wildtyp und Task3^{-/-} Mäusen

Für die Affymetrix Genechip-Analyse wurde mRNA aus der Nebenniere von 1 und 12 Tage alten Wildtypmäusen und Task3^{-/-} Mäusen verwendet. Die folgende Tabelle zeigt altersgetrennt alle positiv und negativ regulierten Gene, die einen Expressionsunterschied ≥ 2 und eine p-Wert < 0.05 zwischen Wildtypmäusen und Task3^{-/-} Mäusen aufweisen.

Adrenales mRNA-Expressionsprofil 1 Tage alter Mäuse:

Gen	Beschreibung	Verhältnis Task3 ^{-/-} vs. WT	p-Wert
Positiv reguliert:			
Ren1	renin 1 structural	9,6	1,1E-04
A2m	alpha-2-macroglobulin	6,3	1,7E-02
Ece1	endothelin converting enzyme-like 1	5,8	5,0E-03
Lypd3	Ly6/Plaur domain containing 3	5,3	2,1E-02
Nefl	neurofilament, light polypeptide	4,2	7,2E-03
Gm10002	predicted gene 10002	3,9	1,1E-02
St6galnac5	ST6(alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5	3,8	2,4E-03
Sv2c	synaptic vesicle glycoprotein 2c	3,6	2,0E-04
Slc16a3	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3	3,6	1,6E-02
Hcn1	hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K+ 1	3,2	4,2E-05
Sez6l	seizure related 6 homolog like	3,2	2,3E-04
Sncg	synuclein, gamma	3,1	4,6E-02
Slc6a17	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 17	3,0	1,1E-04
Gm3893	predicted gene 3893	3,0	1,1E-04
Serpina3n	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N	2,9	1,2E-02
Dpysl5	dihydropyrimidinase-like 5	2,9	4,2E-02
Gadd45b	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	2,8	4,8E-02
Gap43	growth associated protein 43	2,8	4,7E-02
Duxbl	double homeobox B-like	2,7	1,2E-04
Nr4a2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	2,7	1,4E-02
Vgf	VGF nerve growth factor inducible	2,5	2,6E-02
Plac9	placenta specific 9	2,5	1,8E-05
Fam107a	family with sequence similarity 107, member A	2,5	1,4E-02
4933409K07Rik	RIKEN cDNA 4933409K07 gene	2,5	2,1E-04
Ass1	argininosuccinate synthetase 1	2,5	3,0E-02
Itga2	integrin alpha 2	2,4	8,6E-03
Kcnu1	potassium channel, subfamily U, member 1	2,4	3,8E-03
Scn3b	sodium channel, voltage-gated, type III, beta	2,4	3,0E-02
E430024C06Rik	RIKEN cDNA E430024C06 gene	2,4	9,5E-04
Elavl3	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like3 (Hu antigen C)	2,3	2,8E-02
Nov	nephroblastoma overexpressed gene	2,3	5,2E-03
Got1	glutamate oxaloacetate transaminase 1, soluble	2,3	2,2E-02
8430408G22Rik	RIKEN cDNA 8430408G22 gene	2,3	4,1E-03
Clstn3	calsyntenin 3	2,3	1,0E-04
Apof	apolipoprotein F	2,3	1,4E-02
Galnt12	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 2	2,3	7,5E-03
D14Ert449e	DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 449, expressed	2,2	7,6E-06
Stk32b	serine/threonine kinase 32B	2,2	2,8E-03
Scn9a	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha	2,2	6,6E-03
Pappa	pregnancy-associated plasma protein A	2,2	7,9E-03
Trp53inp1	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	2,2	9,4E-03
Cib4	calcium and integrin binding family member 4	2,2	1,7E-03

Akr1b7	aldo-keto reductase family 1, member B7	2,1	3,8E-02
Gm3079	predicted gene 3079	2,1	1,1E-02
4933409K07Rik	RIKEN cDNA 4933409K07 gene	2,1	5,3E-04
Avpi1	arginine vasopressin-induced 1	2,1	4,3E-02
Rasgef1b	RasGEF domain family, member 1B	2,1	1,2E-02
Trim67	tripartite motif-containing 67	2,1	2,2E-02
Egln3	EGL nine homolog 3 (C. elegans) (HIF prolyl hydroxylase 3)	2,1	2,1E-02
Stc2	stanniocalcin 2	2,1	4,6E-03
Pstpip2	proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2	2,1	1,3E-02
Acta1	actin, alpha 1, skeletal muscle	2,0	3,1E-05
Snord116	small nucleolar RNA, C/D box 116 cluster	2,0	4,1E-02

Negativ reguliert:

Ctse	cathepsin E	-5,0	6,5E-03
Car1	carbonic anhydrase 1	-4,5	4,0E-02
Kel	Kell blood group	-4,0	4,6E-02
Cldn13	claudin 13	-4,0	1,7E-02
Rhag	Rhesus blood group-associated A glycoprotein	-3,7	1,6E-02
Rhd	Rh blood group, D antigen	-3,6	2,3E-02
Trpc5	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5	-3,5	2,3E-04
Hemgn	hemogen	-3,4	4,1E-02
Slc14a1	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1	-3,3	1,3E-02
Spna1	spectrin alpha 1	-3,2	2,1E-02
Gypa	glycophorin A	-3,2	3,8E-02
Tspo2	translocator protein 2	-3,1	1,7E-02
Htr1b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B	-3,1	3,5E-05
Cdh10	cadherin 10	-2,9	2,0E-05
Abcb4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	-2,8	1,2E-02
E330027M22Rik	RIKEN cDNA gene, E330027M22Rik	-2,8	2,2E-03
Car2	carbonic anhydrase 2	-2,8	1,4E-02
Fam55b	family with sequence similarity 55, member B	-2,7	3,4E-02
Gata1	GATA binding protein 1	-2,6	7,9E-03
Cyp2f2	cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 2	-2,6	2,5E-02
Lrrc55	leucine rich repeat containing 55	-2,5	2,3E-03
Ermap	erythroblast membrane-associated protein	-2,5	3,0E-02
5730407I07Rik	RIKEN cDNA 5730407I07 gene	-2,5	1,8E-06
Acp5	acid phosphatase 5, tartrate resistant	-2,5	3,9E-03
6030468B19Rik	RIKEN cDNA 6030468B19 gene	-2,5	4,9E-03
Fat3	FAT tumor suppressor homolog 3 (Drosophila)	-2,4	1,2E-04
Mfsd2b	major facilitator superfamily domain containing 2B	-2,4	1,2E-02
Klf1	Kruppel-like factor 1 (erythroid)	-2,4	1,6E-02
Mns1	meiosis-specific nuclear structural protein 1	-2,4	1,2E-03
Kcnn4	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4	-2,4	1,7E-02
E2f2	E2F transcription factor 2	-2,4	2,9E-02
Kcng3	potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 3	-2,4	8,5E-04
Myl9	myosin, light polypeptide 9, regulatory	-2,4	1,3E-03
Slc6a20a	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 20A	-2,3	1,4E-02

Nnt	nicotinamide nucleotide transhydrogenase	-2,3	2,7E-06
Pklr	pyruvate kinase liver and red blood cell	-2,3	1,0E-02
Tspan33	tetraspanin 33	-2,3	3,3E-02
Slc38a5	solute carrier family 38, member 5	-2,3	2,9E-02
B130016D09Rik	RIKEN cDNA B130016D09 cDNA	-2,2	2,2E-04
Itga4	integrin alpha 4	-2,2	2,5E-02
Gstt1	glutathione S-transferase, theta 1	-2,2	1,2E-03
Samd12	sterile alpha motif domain containing 12	-2,2	1,3E-03
Pilra	paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha	-2,1	1,4E-02
Tnfrsf14	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)	-2,1	1,8E-02
Epor	erythropoietin receptor	-2,1	4,4E-02
Sytl5	synaptotagmin-like 5	-2,1	1,7E-02
Tfrc	transferrin receptor	-2,1	3,6E-02
Lama3	laminin, alpha 3	-2,1	1,7E-05
6030469F06Rik	laminin, beta pseudogene	-2,0	4,7E-02
Fam46c	family with sequence similarity 46, member C	-2,0	3,2E-02
Cyp4f14	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 14	-2,0	3,2E-02
Zcchc16	zinc finger, CCHC domain containing 16	-2,0	4,5E-04
Nipal2	NIPA-like domain containing 2	-2,0	2,7E-03

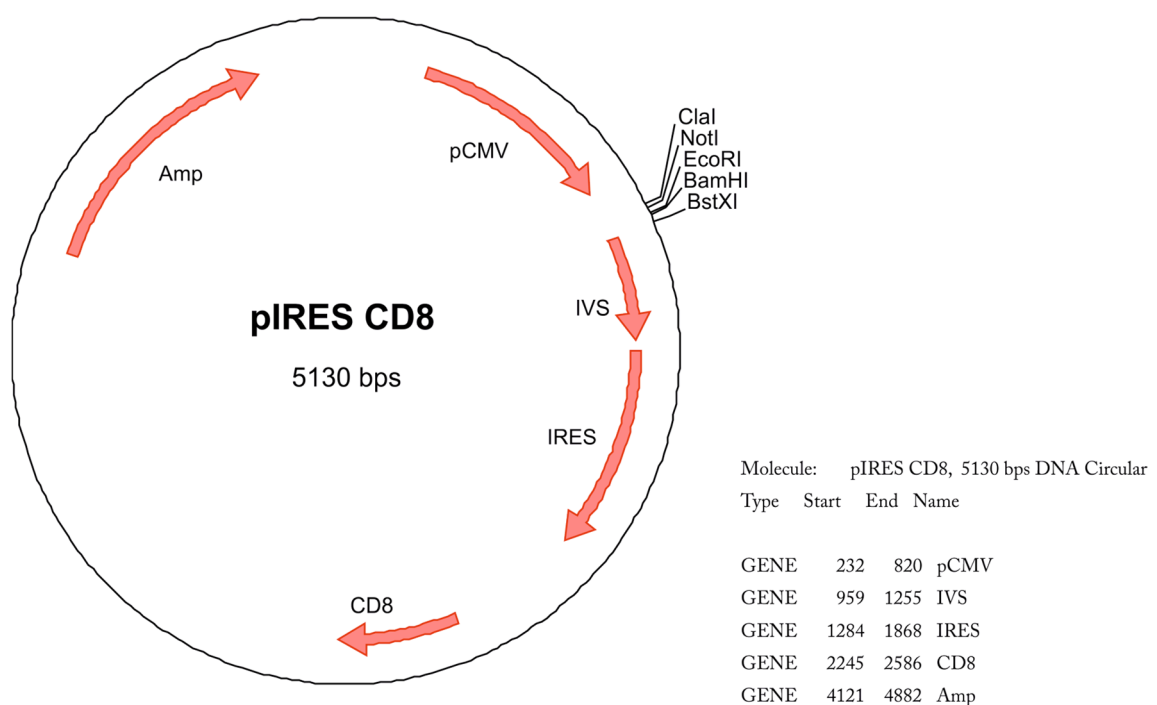
Adrenales mRNA-Expressionsprofil 12 Tage alter Mäuse:

Gen	Beschreibung	Verhältnis Task3 ^{-/-} vs. WT	p-Wert
Positiv reguliert:			
Lcn2	lipocalin 2	10,9	4,9E-02
Gm10002	predicted gene 10002	4,7	8,8E-04
Tac1	tachykinin 1	4,5	1,1E-04
Ctse	cathepsin E	4,5	3,7E-02
Tm4sf4	transmembrane 4 superfamily member 4	4,4	5,0E-03
Gal	galanin	4,3	7,4E-05
Hp	haptoglobin	3,4	3,8E-02
Calb1	calbindin 1	3,1	5,3E-03
Sv2c	synaptic vesicle glycoprotein 2c	3,0	3,8E-04
Vgf	VGF nerve growth factor inducible	2,9	7,0E-03
Serinc2	serine incorporator 2	2,7	1,8E-04
Gm3893	predicted gene 3893	2,7	3,5E-02
4933409K07Rik	RIKEN cDNA 4933409K07 gene	2,7	3,7E-02
P4ha3	procollagen-proline,2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide III	2,6	1,2E-04
C3	complement component 3	2,5	2,4E-02
Ermap	erythroblast membrane-associated protein	2,5	3,6E-02
Adam3	a disintegrin and metallopeptidase domain 3 (cyritestin)	2,5	3,4E-03
Dhrs9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	2,5	3,5E-02
Fst	follicle-stimulating hormone receptor	2,4	1,4E-03
Stk32b	serine/threonine kinase 32B	2,4	9,6E-04
Gda	guanine deaminase	2,4	1,5E-02

Stac2	SH3 and cysteine rich domain 2	2,4	1,1E-04
Sstr2	somatostatin receptor 2	2,3	2,4E-02
Duxbl	double homeobox B-like	2,3	1,3E-03
Clstn3	calsyntenin 3	2,3	6,9E-03
Hsd3b6	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 6	2,2	6,2E-05
Cartpt	CART prepropeptide	2,2	1,9E-02
Slc6a17	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 17	2,2	2,4E-04
D14Ert449e	DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 449, expressed	2,2	1,7E-05
Dclk1	doublecortin-like kinase 1	2,1	8,0E-03
Apobec2	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 2	2,1	2,0E-03
Hs3st2	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2	2,1	1,3E-02
Ecel1	endothelin converting enzyme-like 1	2,1	2,9E-02
Grem1	gremlin 1	2,0	5,7E-03
Omg	oligodendrocyte myelin glycoprotein	2,0	2,6E-02
Dkk3	dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	2,0	3,1E-03

Negativ reguliert:

5730407I07Rik	RIKEN cDNA 5730407I07 gene	-4,8	3,8E-06
Htr1b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B	-3,1	4,5E-03
Gm7455	predicted gene 7455	-2,2	2,2E-03
Zcchc16	zinc finger, CCHC domain containing 16	-2,1	1,2E-03
Fat3	FAT tumor suppressor homolog 3 (Drosophila)	-2,1	9,1E-05
Nnt	nicotinamide nucleotide transhydrogenase	-2,1	1,3E-04

7.1.3 Plasmidkarte pIRES-CD8

7.1.4 Inhibitoren des KCNJ5 L168R-Kanals

Folgende Tabelle führt die zur pharmakologischen Charakterisierung des KCNJ5 L168R-Kanals verwendeten Substanzen auf. Die spezifische, inhibitorische Wirkung wird als prozentualer Reststrom des bei einer Klemmspannung von -120 mV gemessenen Zellstroms nach Substanzgabe angegeben.

Substanz	Konzentration	Verbleibender Strom bei -120 mV [% der Kontrolle]	n	SEM [%]	Klassische Inhibierung	Substanzklasse
EIPA	10 µM	15,4	13	3,7	TRPP3, Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher	Amilorid-Analogon
Benzamil	10 µM	22,2	11	4,6	ENaC und Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher	Diuretika (Amilorid-Analoga)
Phenamil	10 µM	27,5	8	5,8	ENaC	
Amilorid	10 µM	55,0	9	1,6	ENaC and T-Typ-Ca ²⁺ -Kanäle	
Triamteren	10 µM	85,4	6	5,2	ENaC	Pteridin/Diuretikum
Bupivacain	10 µM	16,6	5	7,0	spannungsaktivierte Na ⁺ -Kanäle	Lokalanästhetikum
Lidocain	100 µM	66,4	6	8,3		
KB-R7943	10 µM	5,8	9	1,5	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher, Ionenkanäle	
Verapamil	10 µM	20,5	9	5,6	L-Typ-Ca ²⁺ -Kanäle	Phenylalkylamin
Diltiazem	10 µM	53,9	6	3,1		Benzothiazepin
Nifedipin	10 µM	87,2	6	6,6		Dihydropyridin
Cariporide	100 µM	65,9	8	6,7	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher	
Flufenamat	100 µM	88,9	7	2,6	Cyclooxygenase, Hyaluronidase, unspezifische Kationenkanäle	Anthranilsäurederivat
Ba ²⁺	5 mM	74,4	5	2,9	K ⁺ -Kanäle	
Tertiapin Q	1 µM	103,6	6	11,8	K ⁺ -Kanäle (KCNJ5, KCNJ3, ROMK1, MaxiK)	Toxin der Honigbiene

7.2 Personenbezogene Daten

7.2.1 Veröffentlichte Publikationen

Bandulik*, S., **Tauber***, P., Penton, D., Schweda, F., Tegtmeier, I., Sterner, C., Lalli, E., Lesage, F., Hartmann, M., Barhanin, J. and Warth, R. (2013)

Severe hyperaldosteronism in neonatal Task3 potassium channel knockout mice is associated with activation of the intraadrenal renin-angiotensin system.

Endocrinology 154, 2712–2722.

Mulatero*, P., **Tauber***, P., Zennaro*, M.-C., Monticone, S., Lang, K., Beuschlein, F., Fischer, E., Tizzani, D., Pallauf, A., Viola, A., Amar, L., Williams, T.A., Strom, T.M., Graf, E., Bandulik, S., Penton, D., Plouin, P.-F., Warth, R., Allolio, B., Jeunemaitre, X., Veglio, F. and Reincke, M. (2012)

KCNJ5 mutations in European families with nonglucocorticoid remediable familial hyperaldosteronism.

Hypertension 59, 235–240.

Beuschlein, F., Boulkroun, S., Osswald, A., Wieland, T., Nielsen, H.N., Lichtenauer, U.D., Penton, D., Schack, V.R., Amar, L., Fischer, E., Walther, A., **Tauber, P.**, Schwarzmayr, T., Diener, S., Graf, E., Allolio, B., Samson-Couterie, B., Benecke, A., Quinkler, M., Fallo, F., Plouin, P.-F., Mantero, F., Meitinger, T., Mulatero, P., Jeunemaitre, X., Warth, R., Vilsen, B., Zennaro, M.-C., Strom, T.M. and Reincke, M. (2013)

Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension.

Nature Genetics 45, 440-4, 444e1-2.

Penton, D., Bandulik, S., Schweda, F., Haubs, S., **Tauber, P.**, Reichold, M., Cong, L.D., El Wakil, A., Budde, T., Lesage, F., Lalli, E., Zennaro, M.-C., Warth, R. and Barhanin, J. (2012)

Task3 potassium channel gene invalidation causes low renin and salt-sensitive arterial hypertension.

Endocrinology 153, 4740–4748.

7.2.2 Publikationen in Revision

Tauber*, P., Penton*, D., Tegtmeier, I., Stindl, J., Beuschlein, F., Reincke, M., Barhanin, J., Bandulik, S., Warth, R. (2013)

Pharmacology and pathophysiology of mutated KCNJ5 found in adrenal aldosterone producing adenomas

Endocrinology

7.2.3 Kongressbeiträge

Tauber, P., Penton, D., Tegtmeier, I., Beuschlein, F., Warth, R., Bandulik, S.

The role of the sodium-calcium-exchanger NCX in adenoma-like adrenal cells (Poster)

92nd Annual Meeting of the German Physiological Society, 02.-05.03.2013, Heidelberg, Deutschland

Bandulik, S., **Tauber, P.**, Penton, D., Sterner, C., Tegtmeier, I., Schweda, F., Barhanin, J., Lesage, F., Warth, R.

Deletion of TASK3 K⁺ channels leads to hyperaldosteronism in neonatal mice (Poster)

International Congress of Endocrinology, 05.-09.05.2012, Florenz, Italien

Mulatero, P., **Tauber, P.**, Zennaro, M., Monticone, S., Lang, K., Beuschlein, F., Fischer, E., Burrello, J., Pallauf, A., Galmozzi, M., Amar, L., Williams, T., Strom, T., Graf, E., Bandulik, S., Penton, D., Plouin, P., Warth, R., Allolio, B., Jeunemaitre, X., Veglio, F., Reincke, M.

KCNJ5 Mutations in European Families with Non-Glucocorticoid Remediable Familial Hyperaldosteronism (Poster)

International Congress of Endocrinology, 05.-09.05.2012, Florenz, Italien

Tauber, P., Bandulik, S., Penton, D., Barhanin, J., Lesage, F., Warth, R.

Deletion of TASK3 K⁺ channels leads to hyperaldosteronism in adrenal glands of neonatal mice (Vortrag)

91st Annual Meeting of the German Physiological Society, 22. - 25.03.2012, Dresden, Deutschland

7.2.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die im Methodenteil und in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Diese Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 05.12.2013

Philipp Tauber

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während der letzten drei Jahre bei der Durchführung und Erstellung meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben. Jeder Einzelne von ihnen hat auf seine Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

An erster Stelle geht mein Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. Richard Warth für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Mittel zur Durchführung dieser Arbeit. Auf seine unkomplizierte und freundliche Art schaffte er es immer wieder mich zu motivieren und für die wissenschaftliche Forschung zu begeistern, indem er mir die Wichtigkeit meiner Arbeit vor Augen führte. Besonders hervorheben möchte ich dabei sein stetes Interesse an meinen Experimenten und seine Offenheit für eigene Ideen. Die Tür zu seinem Büro stand für mich jederzeit offen, was nicht selbstverständlich ist. Vielen Dank dafür!

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank der Arbeitsgruppe Nebenniere. Dr. Sascha Bandulik danke ich für die exzellente, umfassende Betreuung, seine wissenschaftliche Beratung und Diskussionsbereitschaft während der letzten drei Jahre und für die Hilfe bei der Auswertung und Korrektur meiner Arbeit. Vielen Dank auch an die immer fleißige Ines Tegtmeier für die Durchführung zahlreicher Real-time PCR-Läufe und an Christina Sterner für ihre permanente Hilfsbereitschaft. Doktore David Penton-Ribas (mittlerweile an der Université de Nice Sophia Antipolis, Frankreich) danke ich für die Einführung in die Elektrophysiologie und Ca^{2+} -Messung, aber vor allem für seine kubanische Lebensfreude mit der er stets den Laboralltag auflockerte. Prof. Dr. Frank Schweda und Katharina Ehm (Institut für Physiologie, Universität Regensburg) sei gedankt für die Durchführung und Auswertung der Reninmessungen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei der kompletten Arbeitsgruppe Warth (Richard, Karo, Ines, Christina, Sascha, Carsten, Julia, Evi, Maria, Michaela und Mar(ta)kus) für die gegenseitige Unterstützung, den Zusammenhalt und die allzeit gute Atmosphäre im Labor. Vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit, aber auch für viele lustige Momente auf Kongressen, Betriebsausflügen oder aber auch privaten Feiern.

Zuletzt möchte ich mich herzlich bei meiner Familie und meiner Freundin Franka bedanken, die mir bereits während des Studiums aber auch besonders während meiner Promotion immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Gerade in den teils stressigen und herausfordernden Phasen während der Anfertigung der Dissertationsschrift konnte ich mich stets auf ihre Unterstützung und ihr Verständnis verlassen.