

**Untersuchungen zur Entstehung
des primären Hyperaldosteronismus:
Einfluss von Mutationen der Na⁺/K⁺-ATPase auf
adrenokortikale Zellen**



DISSERTATION

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

vorgelegt von

Julia Stindl aus Dachau

Im Jahr 2015

Promotionsgesuch eingereicht am:

18.9.2015

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. med. Richard Warth

Die Arbeit wurde durchgeführt:

Januar 2013 – August 2015

Unterschrift

(Julia Stindl)

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorgestellten Arbeit wurde der Einfluss von Mutationen der Na^+/K^+ -ATPase, welche in Aldosteron-produzierenden Adenomen (APAs) gefunden wurden, auf die Physiologie adrenaler Zellen analysiert.

Aldosteron wird in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde gebildet und dessen Sekretion wird durch Angiotensin II (Ang II) und hohes Plasmakalium stimuliert. Glomerulosazellen haben ein hyperpolarisiertes Membranpotenzial. Eine Depolarisation der Membran, z. B. durch Ang II oder Hyperkaliämie, führt zum Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Levels, was die Aldosteronsynthese triggert. Die autonome Aldosteronsekretion (primärer Hyperaldosteronismus), z. B. auf Grund eines Aldosteron-produzierenden Adenoms, verursacht ~10 % aller diagnostizierten Hypertonien. Vor wenigen Jahren wurde festgestellt, dass somatische Mutationen der $\alpha 1$ -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase in 5-6 % der APAs die pathologische Aldosteronsekretion hervorrufen. Die Na^+/K^+ -ATPase pumpt Na^+ und K^+ entgegen ihrer Gradienten über die Zellmembran, dadurch ist sie essentiell für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Ionenhomöostase und des Membranpotenzials. APA-assoziierte Mutationen der Na^+/K^+ -ATPase bewirken den Verlust der Pumpfunktion und vermutlich einen pathologischen Na^+ - und/oder H^+ -Einstrom in die Zelle. Mutierte Adenomzellen waren depolarisiert und es wird vermutet, dass dadurch das zytosolische Ca^{2+} -Level erhöht und die Aldosteronsynthese aktiviert wird. In dieser Studie wurden erstmals die Auswirkungen der Na^+/K^+ -ATPase Mutationen (L104R, V332G und G99R) auf die Ca^{2+} - und pH-Homöostase in adrenalen Zellen betrachtet.

Alle analysierten Mutationen bewirkten eine Depolarisation der Zellmembran in den adrenalen NCI-H295R Zellen und die autonome Sekretion von Aldosteron. Wir beobachteten, dass die Depolarisation zum einen auf eine veränderte intrazelluläre Na^+ - und K^+ -Homöostase und zum anderen in Zellen mit der V332G Mutation auf einen pathologischen Na^+ -Einstrom zurückzuführen ist. Interessanterweise war trotz der Depolarisation das basale Ca^{2+} -Level nicht signifikant verändert. Dennoch waren sowohl das intrazelluläre Ca^{2+} -Signaling als auch die elektrophysiologische Antwort nach Stimulation mit Ang II und K^+ durch die Mutationen gestört.

Die erhobenen Daten bestätigen zudem den beobachteten H^+ -Leckstrom der L104R Mutation und dies konnten wir entgegen der Vorhersagen erstmals auch für die V332G Mutation nachweisen. Trotz einer verstärkten Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers, führten die beiden Mutationen zur Ansäuerung des basalen intrazellulären pHs (pH_i)

und zu einer gestörten pH-Regulation der Zellen. Der mögliche Beitrag des pH_i zur Pathophysiologie mutierter Zellen wurde durch das gezielte Ansäuern untransfizierter NCI-H295R Zellen und die dadurch stimulierte Aldosteronsekretion untermauert. Die Mutation G99R wies keine veränderte pH-Homöostase auf und zeigte generell einen milderen Phänotyp als die anderen Mutationen. Die autonome Aldosteronsekretion ist vermutlich auf das Zusammenspiel verschiedener pathologischer Signalwege zurückzuführen.

Zusätzlich zeigt die Studie die Bedeutung des intrazellulären pH-Werts für die Aldosteronsekretion und trägt somit zum grundlegenden Verständnis der zellulären Regulation der Aldosteronsekretion bei.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Arterielle Hypertonie.....	1
1.2. Die Nebennieren	2
1.2.1. Aldosteronbiosynthese.....	3
1.3. Wirkung von Aldosteron	6
1.4. Systemische Regulation des Aldosterons	8
1.5. Zelluläre Regulation der Aldosteronsynthese	10
1.5.1. Kalium-induzierte Aldosteronsynthese	10
1.5.2. Regulation der Aldosteronsynthese durch Ang II	11
1.6. Bedeutung der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase für die Aldosteronsynthese.....	14
1.6.1. Das Transportprotein Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	14
1.6.2. Rolle der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase bei der Aldosteronregulation	16
1.7. Primärer Hyperaldosteronismus (PHA).....	17
1.7.1. Pathophysiologie des PHA	17
1.7.2. Mutationen der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase als Ursache für PHA	19
1.8. Zielsetzung der Arbeit	21
 2. MATERIAL UND METHODEN	 23
2.1. Material.....	23
2.1.1. Geräte.....	23
2.1.2. Substanzen	23
2.1.3. Enzyme und Kits	25
2.1.4. Oligonukleotide.....	25
2.1.5. Lösungen und Puffer	26
2.1.6. Expressionsvektoren	29
2.1.7. Rattenspezifischer anti-Na ⁺ /K ⁺ -ATPase Antikörper.....	30

2.2. Methoden	30
2.2.1. Zellkultur und Transfektion.....	30
2.2.1.1. Transfektion mit Lipofectamin™ 2000 und 3000.....	31
2.2.1.2. Transfektion von NCI-H295R Zellen durch Elektroporation	31
2.2.2. Western Blot.....	31
2.2.2.1. Proteinisolation	31
2.2.2.2. SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
2.2.2.3. Proteintransfer und Immunodetektion	32
2.2.3. Immunfluoreszenzfärbung transfizierter NCI-H295R Zellen.....	32
2.2.4. Genexpressionsanalyse.....	33
2.2.4.1. RNA-Isolation und reverse Transkription	33
2.2.4.2. Quantitative Realtime PCR (qPCR).....	33
2.2.5. Aldosteron-ELISA.....	35
2.2.6. Flammenphotometrie	35
2.2.7. Patch-Clamp Experimente	36
2.2.7.1. Ganzzellmessungen	37
2.2.7.2. Messungen in der „perforated-patch“-Konfiguration	37
2.2.8. Live cell imaging.....	37
2.2.8.1. Intrazelluläre Ca^{2+} -Messungen.....	37
2.2.8.2. Intrazelluläre pH-Messungen.....	38
2.2.9. Statistik.....	39
3. ERGEBNISSE.....	40
3.1. Expression der Na^+/K^+ -ATPase in NCI-H295R Zellen.....	40
3.2. Analyse des Steroidhormonsynthesewegs in Zellen mit mutierter Na^+/K^+ -ATPase	42
3.2.1. Expression steroidogener Enzyme	43
3.2.2. ATP1A1-Mutationen steigerten die Aldosteronsynthese.....	44
3.3. Einfluss der Mutationen auf das Membranpotenzial und den Elektrolythaushalt....	44
3.3.1. Mutationen verursachten eine Membrandepolarisation	45

3.3.2. Veränderte intrazelluläre Na ⁺ - und K ⁺ -Homöostase	46
3.3.3. Effekt von K ⁺ und Ang II auf das Membranpotenzial adrenaler Zellen.....	47
3.4. Einfluss der mutierten Na ⁺ /K ⁺ -ATPasen auf das intrazelluläre Ca ²⁺ -Signal nach Stimulation mit K ⁺ und Ang II.....	48
3.5. Na ⁺ /K ⁺ -ATPase Mutationen führten zu einer gestörten pH-Homöostase.....	51
3.6. Erhöhte Aktivität des Na ⁺ /H ⁺ -Austauschers (NHE).....	53
3.7. Intrazelluläre Ansäuerung durch die Expression des mutierten Kaliumkanals KCNJ5 ^{L168R}	55
3.8. Einfluss des intrazellulären pH auf die Expression der Aldosteronsynthase	56
4. DISKUSSION	58
4.1. Charakterisierung der ATP1A1-Mutationen G99R und V332G in HEK-Zellen	60
4.2. Gestörte intrazelluläre Ionenhomöostase und pathologische Membrandepolarisa- tion in adrenalen Zellen mit ATP1A1 _{mut}	60
4.3. Erhöhte Aldosteronsekretion trotz unverändertem basalen Ca ²⁺ -Level in adrenalen Zellen	62
4.4. Veränderte Zellantwort auf die Stimuli Ang II und K ⁺ in ATP1A1 _{mut} exprimierenden Zellen	64
4.5. Gestörte intrazelluläre pH-Regulation durch Mutationen der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	66
4.6. Trägt die zytosolische Ansäuerung zur pathologischen Aldosteronsekretion bei? .	68
4.7. Ausblick	71
LITERATURVERZEICHNIS	73
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	90
PUBLIKATIONEN.....	92
DANKSAGUNG.....	94

KAPITEL 1

EINLEITUNG

1.1. Arterielle Hypertonie

Erhöhter Blutdruck ist einer der größten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen und stellt somit indirekt eine der Haupttodesursachen unserer Gesellschaft dar. Eine aktuelle Einschätzung der Prävalenz zeigt, dass etwa 30 % der Weltbevölkerung an Hypertonie leiden, wobei das Risiko mit zunehmendem Alter stetig steigt. Die arterielle Hypertonie verstärkt die Gefahr für Schlaganfall, Herzinfarkt, Herzversagen, Niereninsuffizienz und Demenz (Kearney et al. 2004; Bromfield 2014).

Bei etwa 90 % der Hypertoniepatienten lässt sich keine eindeutige Ursache für das Auftreten des Bluthochdrucks feststellen, hierbei spricht man von einer primären oder essentiellen Hypertonie. Bei nur etwa 10 % der Patienten ist die Ursache der Hypertonie diagnostizierbar, d.h. eine gezielte kausale Behandlung möglich. Der Bluthochdruck manifestiert sich hier als Folge einer Grunderkrankung und wird daher als sekundäre Hypertonie bezeichnet. Krankheitsursachen sind u.a. Akromegalie, Nierenarterienstenose, Phäochromozytome sowie primärer Hyperaldosteronismus (PHA). Letzterer gilt als Hauptursache für die sekundäre Hypertonie.

Das Aldosteron wird hauptsächlich in den Nebennieren gebildet und entfaltet seine Wirkungen über die Aktivierung des Mineralocorticoidrezeptors (MR). Aldosteron erhöht die Natriumrückresorption und die Kaliumsekretion in den Nieren, dadurch spielt

es eine wesentliche Rolle im Elektrolyt- und Wasserhaushalt und somit bei der Regulation des Blutdrucks. Eine übermäßige Stimulation der MR durch einen Aldosteronexzess kann, neben den negativen Effekten durch den resultierenden Bluthochdruck, das Risiko für Entzündungen, kardiale Fibrose, psychische Erkrankungen wie Depression sowie kardiovaskuläre Erkrankungen erhöhen (Marney et al. 2007). Aufgrund dieser großen pathophysiologischen Bedeutung des Aldosterons sind möglichst kausal angreifende therapeutische Strategien beim PHA wünschenswert. Das Verständnis über die Mechanismen, welche für die überschießende Aldosteronproduktion verantwortlich sind, ist jedoch noch sehr lückenhaft.

1.2. Die Nebennieren

Die Nebenniere ist eine paarige endokrine Drüse, welche sich an den oberen Nierenpolen befindet. Sie ist umgeben von der Nierenfaszie, eine Bindegewebsschicht, welche sowohl Niere als auch Nebenniere umschließt. Anatomisch und funktionell kann die Nebenniere in zwei Regionen unterteilt werden, das Nebennierenmark (Medulla) und die Nebennierenrinde (Cortex, Abb. 1). Obwohl sich beides in einer Drüse befindet, stellen die Medulla und der Cortex zwei Organe mit verschiedenen Funktionen dar, welche sich jedoch gegenseitig beeinflussen. Im Innern der Nebenniere liegt die Medulla, sie entsteht aus der Neuralleiste, ist also ektodermalen Ursprungs. Die chromaffinen Zellen der Medulla produzieren den Hauptteil der zirkulierenden Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin, deren Sekretion hauptsächlich durch nervale Reize stimuliert wird (Robinson et al. 1983; Strack et al. 1989; Cooper et al. 1990; Aunis et al. 1999). Im Gegensatz zur Medulla ist die Nebennierenrinde mesodermalen Ursprungs. Die humane Nebennierenrinde besteht aus drei Zonen: der Zona reticularis, Zona fasciculata und der Zona glomerulosa. Alle drei Zonen unterscheiden sich deutlich in ihren strukturellen und funktionellen Eigenschaften. Die innerste der drei Zonen, die Zona reticularis, besteht hauptsächlich aus netzförmig angeordneten, kleinen Zellen, welche vorwiegend Androgene sezernieren. Zwischen reticularis und glomerulosa liegt die Zona fasciculata, sie ist die größte Zone und nimmt knapp 80 % des adrenalen Cortexes ein. Sie produziert zum größten Teil das Glucocorticoid Cortisol. In dieser Zone sind die Zellen groß, lipidbeladen und strangförmig, radial zur Medulla orientiert, angeordnet. Die äußerste Schicht ist die Zona glomerulosa; die kleinen, knäueelförmig angeordneten Zellen sezernieren das Mineralocorticoid Aldosteron (Sucheston et al. 1968). Die

zonenspezifische Sekretion der einzelnen Steroidhormone ist an die Expression bestimmter Enzyme gebunden. Essentiell sind hier die Enzyme 11 β -Hydroxylase und die Aldosteronsynthase. Hauptsächlich in der Zona fasciculata exprimiert, katalysiert die 11 β -Hydroxylase den letzten Schritt der Cortisolbiosynthese, während die Aldosteronsynthase, ausschließlich in der Zona glomerulosa exprimiert, den letzten Schritt der Aldosteronsynthese katalysiert (Young et al. 2003).

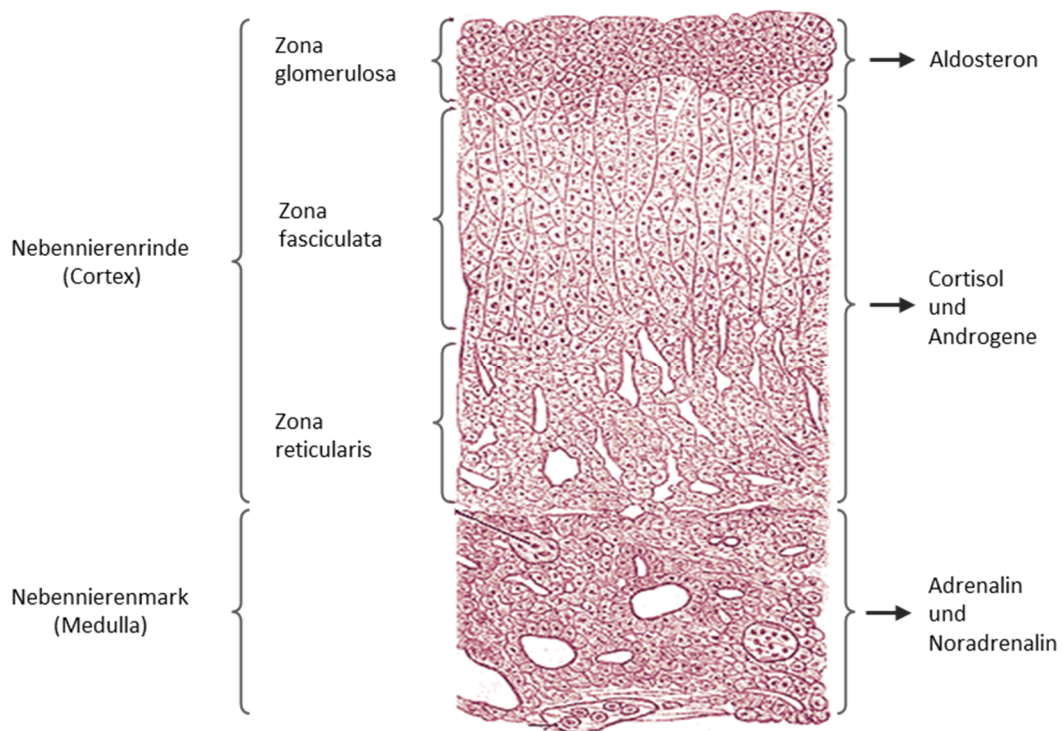


Abbildung 1: Schematischer Querschnitt durch die humane Nebenniere.

Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau der Nebenniere, mit Nebennierenmark und Nebennierenrinde und deren sezernierten Hormone. Die Nebennierenrinde wird in drei Zonen aufgeteilt (von außen): Zona glomerulosa, fasciculata und reticularis. (modifiziert nach Gray 1918)

1.2.1. Aldosteronbiosynthese

Der Vorläufer für die Synthese von Corticoiden ist das Cholesterin. Die größte Quelle für Cholesterin sind die im Blut zirkulierenden Low-density Lipoproteine (LDL), welche über den LDL-Rezeptor internalisiert und abgebaut werden. Das dadurch frei werdende Cholesterin wird als Cholesterinester in Fetttropfchen im Zytosol gespeichert

und kann bei Bedarf für den Steroidhormonsynthese bereitgestellt werden. Des Weiteren wird Cholesterin auch *de-novo* in der Nebenniere aus dem Acetyl-Coenzym-A synthetisiert (Mason et al. 1987; Capponi 2002). Ein Überblick über den adrenalen Steroidsyntheseweg gibt Abb. 2. Bei der Aldosteronsynthese sind insgesamt drei Cytochrom-P450-Mischoxygenasen und eine Hydroxysteroid-Dehydrogenase beteiligt. Die Enzyme „*Cholesterol side-chain cleavage*“ (CYP11A1), 21-Hydroxylase (CYP21A2) und die Aldosteronsynthase (CYP11B2) gehören zu der Familie der Cytochrom-P450-Enzyme. Während sich die CYP11A1 und CYP11B2 in der inneren mitochondrialen Membran befinden, ist die CYP21A2 in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert (Pelletier et al. 2001; Payne et al. 2004). Diese Enzyme besitzen alle eine Häm-Gruppe und benötigen NADPH als Coenzym, von welchem sie ein Elektron aufnehmen, um die entsprechenden Reaktionen katalysieren zu können (Lambeth et al. 1982). Das vierte Enzym ist die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD; HSD3B), im Menschen werden zwei Isozyme gebildet HSD3B1 und HSD3B2, welche sich in der Membran des ER befinden (Pelletier et al. 2001). Der erste Schritt der Aldosteronsynthese ist die Umwandlung des Cholesterins zu Pregnenolon durch die Abspaltung der Seitenkette am C₂₀ des Cholesterins durch die CYP11A1 in den Mitochondrien (Lieberman et al. 2001). Um diese entscheidende Reaktion der Steroidsynthese zu ermöglichen, muss das Cholesterin zunächst von der äußeren mitochondrialen Membran über den hydrophilen Intermembranraum zur inneren mitochondrialen Membran transportiert werden. Dieser Schritt wird durch das „steroidogene akute regulatorische Protein“ (StAR) vermittelt. Bisher ist noch kein intrazellulärer Speichermechanismus für die Steroidhormone bekannt, daher wird dieser Transport als ein die Syntheserate limitierender Schritt angesehen und unterliegt strengster intrazellulärer Regulation (Lin et al. 1995; Stocco et al. 2005). Das entstandene Pregnenolon diffundiert durch das Zytosol zum ER, wo es durch die 3 β -HSD zu Progesteron oxidiert wird, welches wiederum durch die CYP21A2 am C₂₁-Atom zu 11-Deoxycorticosteron (11-DOC) hydroxyliert wird. In den Mitochondrien wird letztendlich aus 11-DOC über drei aufeinanderfolgende Reaktionen Aldosteron synthetisiert. Über eine Hydroxylierung am C₁₁ entsteht Corticosteron, welches durch eine Hydroxylierung gefolgt von einer Oxidation am C₁₈ zu Aldosteron umgewandelt wird. Diese letzten drei Reaktionen werden durch die Aldosteronsynthase (CYP11B2) katalysiert. Bis zum Progesteron ist die Synthese von Aldosteron in der Zona glomerulosa mit der Cortisolsynthese in der Zona fasciculata identisch (Wada et al. 1985; Payne et al. 2004; Connell et al. 2005).

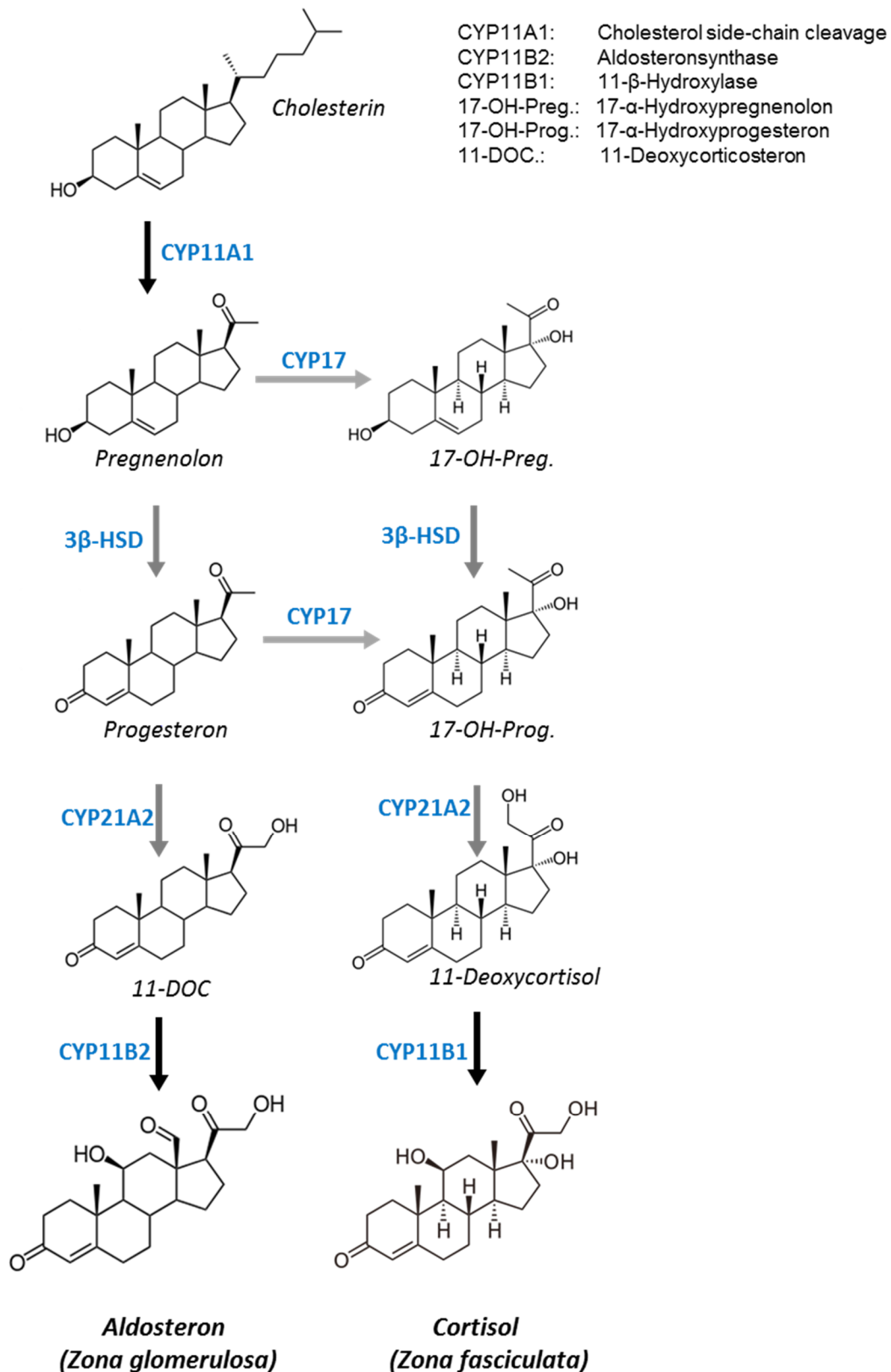


Abbildung 2: Steroidbiosynthese in der humanen Zona glomerulosa und fasciculata. Schwarze Pfeile zeigen enzymatische Reaktionen in den Mitochondrien, graue Pfeile zeigen enzymatische Reaktionen an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (Erklärung siehe Text).

Durch die Expression der Aldosteronsynthase und die fehlende Expression der CYP17 (17 α -Hydroxylase,17,20-Lyase) wird in der Zona glomerulosa die spezifische Aldosteronsynthese garantiert. Die Expression der CYP17 und der CYP11B1 in der Zona fasciculata hingegen ist für die Cortisolsynthese in diesen Zellen notwendig, da die CYP17 Pregnenolon und Progesteron metabolisiert und dem Syntheseweg für Cortisol zugänglich macht (Young et al. 2003; Miller 2008).

Um ein konstantes Level an Aldosteron im Plasma zu halten, muss das Hormon stetig neu gebildet werden, da das sezernierte Aldosteron eine relativ kurze Plasmahalbwertszeit von etwa 15 min hat, bevor es in der Leber zu Tetrahydroaldosteronglucuronid und Aldosteron-18-Glucuronid metabolisiert und über den Urin ausgeschieden wird.

1.3. Wirkung von Aldosteron

Mineralocorticoide regulieren den Flüssigkeits- und Salzhaushalt im Körper und sind für die Blutdruckregulation von großer Bedeutung. Das wichtigste mineralocorticoide Hormon ist Aldosteron. Es vermittelt seine Effekte über den Mineralocorticoidrezeptor (MR), einen ligandengesteuerten Transkriptionsfaktor, der ohne Ligand frei im Zytosol vorliegt (Alnemri et al. 1991; Lombès et al. 1994; Fejes-Tóth et al. 1998). Da einer der wichtigsten Aufgaben des Aldosterons die Retention von Na⁺ darstellt, ist es nicht verwunderlich, dass die MR besonders stark in den Na⁺-transportierenden Epithelien des distalen Nephrons der Niere, des distalen Kolons und der Speichel- und Schweißdrüsen exprimiert sind. Liganden-Bindungs-Studien mit Steroiden zeigten, dass die MR eine ähnliche Affinität für Glucocorticoide wie für Aldosteron aufweisen (Arriza et al. 1987; Hirasawa et al. 1997). Die Plasmaspiegel von Glucocorticoiden sind allerdings etwa 100- bis 1000-fach höher als die von Aldosteron. Dadurch würden sie einen Großteil der MR okkupieren und die Aldosteronbindung im Zielorgan verhindern. Um dies zu verhindern, wird in den Zielgeweben des Aldosterons die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-2 (11 β -HSD2) exprimiert, ein Enzym welches Cortisol in das inaktive Cortison umwandelt (Funder et al. 1988; Edwards et al. 1988). Dieser inaktive Metabolit kann die MR nicht stimulieren und stellt sicher, dass die MR für Aldosteron zur Verfügung stehen. Die organspezifische Expression der 11 β -HSD2 garantiert somit die organspezifische Wirkung von Aldosteron.

Die Bindung von Aldosteron an einen MR führt zu einer Konformationsänderung des Ligand-Rezeptor-Komplexes und zur Translokation in den Zellkern, wo er die Transkription bestimmter Gene modifiziert (Trapp et al. 1995; Rogerson et al. 2004).

Als „*early-response*“-Gen wird die „Serum- und Glucocorticoid-induzierbare Kinase 1“ (SGK-1) exprimiert. Akut erhöht die SGK-1 die Proteindichte des Kaliumkanals ROMK, der Na^+/K^+ -ATPase und des epithelialen Na^+ -Kanals ENaC in der Zellmembran (Bhargava et al. 2001; Summa et al. 2001; Yoo et al. 2003). Die SGK-1 reguliert die akute Oberflächenexpression des ENaC vermutlich über die Phosphorylierung des „ENaC regulatory protein“ (Nedd 4-2). Dessen Bindung an den ENaC wird so verhindert und Nedd 4-2 kann den Abbau des Kanals nicht induzieren (Flores et al. 2005).

Zusätzlich wird die Synthese des ENaC, des ROMK, der Na^+/K^+ -ATPase und des Na^+/H^+ -Austauschers (NHE) im distalen Tubulus und den Hauptzellen des Sammelrohrs erhöht (Wald et al. 1998; Stockand 2002; Thomas et al. 2011). All dies führt zu einer verstärkten tubulären Resorption von Na^+ , gleichzeitig wird die Sekretion von K^+ und H^+ gesteigert. An die Natriumaufnahme ist auch eine vermehrte Wasserresorption gebunden, was letztendlich das Plasmavolumen und den Blutdruck erhöht. Ähnliche Mechanismen konnten für das Kolon und die Schweißdrüsen nachgewiesen werden (Collins et al. 1970; Cho et al. 1998; Malsure et al. 2014).

Seit den achtziger Jahren wurde die MR-Expression in vielen weiteren nicht-epithelialen Geweben nachgewiesen, darunter im Herzen (Kayes-Wandover et al. 2000; Lombès et al. 1994), dem Gefäßendothel (Takeda et al. 1997) und dem zentralen Nervensystem (ZNS; McEwen et al. 1986). Im ZNS aktiviert Aldosteron das sympathische Nervensystem und bewirkt einen gesteigerten Salzappetit (Sakai et al. 1996; Geerling et al. 2006; Huang et al. 2008). Im Endothel beeinflusst es direkt die Vasokonstriktion und dadurch den Blutdruck (Feldman et al. 2013). In diesen Geweben vermutet man, dass neben der „klassischen“ Regulation auf transkriptioneller Ebene Aldosteron auch über alternative Mechanismen wirkt. Diese vermitteln binnen Sekunden die Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden u. a. über die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Levels, die Aktivierung des NHE und die Aktivierung der second-messenger cAMP, DAG und IP_3 (Wehling et al. 1990; Wehling et al. 1994; Christ et al. 1995; Gekle et al. 1996; Schneider et al. 1997; Harvey et al. 2000). Auf Grund widersprüchlicher Studien wird allerdings noch kontrovers diskutiert, ob diese Wirkung über den „klassischen“ MR, einen membranständigen MR oder über MR-unabhängige Wege ausgelöst wird (Haseroth et al. 1999; Michea et al. 2005; Wehling et al. 2006; Feldman et al. 2013). Aldosteron induziert neben seinen mineralocorticoiden Effekten auch pathologische Gewebsveränderungen v. a. in den Nieren, am Herzen, sowie an Gefäßen, die letztendlich zu Herzinsuffizienz und einem erhöhten Schlaganfallrisiko führen können. Der pathologischen Wirkung der MR-

Stimulation liegen u. a. reno-kardiovaskuläres Remodeling, oxidativer Stress, die Aktivierung proinflammatorischer Prozesse und myokardiale/endotheliale Fibrose zu Grunde (Rocha et al. 2000, Rocha et al. 2001; Rossi et al. 2005; Stier et al. 2005; Gekle et al. 2009; Guichard et al. 2013). Obwohl eine große Anzahl an Studien diese Effekte *in vivo* und *in vitro* bestätigen konnten, sind die molekularen Mechanismen, über welche das Aldosteron seine negative Wirkung entfaltet weitgehend unverstanden. Da diese kardiovaskulären Veränderungen bereits bei einem normalen Plasmaaldosteron-Level auftreten können (Tomaschitz et al. 2010), werden die pathologischen Effekte durch Aldosteron vermutlich nicht allein über die klassische MR-Aktivierung erzeugt, sondern im Zusammenspiel mit weiteren systemischen Faktoren (Acelajado et al. 2010).

1.4. Systemische Regulation des Aldosterons

Aufgrund der vielseitigen Wirkmechanismen des Aldosterons ist es essentiell, dass die Sekretion dieses Hormons strengen Regulationsmechanismen unterliegt. Die wichtigsten sind Hyperkaliämie, Hyponatriämie und ein Abfall des Blutdrucks. Während die Hyperkaliämie direkt Glomerulosazellen stimuliert, führen die letzteren beiden über die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) indirekt zu einer Aldosteronfreisetzung.

Ein Na^+ -Mangel oder eine verringerte renale Perfusion führen in den juxtaglomerulären Zellen der Niere zu einer vermehrten Freisetzung der Peptidase Renin in den Blutkreislauf. Des Weiteren aktiviert ein erniedrigter Blutdruck den Sympathikus. Die aktivierten sympathischen Nerven in der Nähe Renin-produzierender Zellen stimulieren die adrenergen Rezeptoren in den genannten Zellen und es kommt zur Freisetzung von Renin. Das proteolytische Enzym Renin spaltet im Plasma das Glycoprotein Angiotensinogen, welches in der Leber gebildet und sezerniert wird, und es entsteht das biologisch inaktive Prohormon Angiotensin I (Ang I). Ang I wird proteolytisch durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) in das biologisch aktive Oktapeptid Angiotensin II (Ang II) gespalten. Das ACE befindet sich hauptsächlich an der Zelloberfläche von Endothelzellen der Lunge, aber auch denen des Gehirns, Darm, Niere, Nebenniere und Hoden. Ang II ist einer der Hauptmediatoren bei der Blutdruckregulation und vermittelt diese Effekte durch die Bindung an den AT1-Rezeptor. Abhängig von der Zell- und Gewebeexpression dieses Rezeptors bewirkt Ang II u. a. eine Vasokonstriktion, eine positiv inotrope und chronotrope Wirkung auf Cardiomyozyten, eine erhöhte Na^+ -Resorption in den Nieren und eine Verstärkung des

Durstgefühls und des Salzappetits (durch die Freisetzung von Vasopressin). In den Nebennieren führt Ang II zur Aldosteronsekretion in den adrenalen Glomerulosazellen.

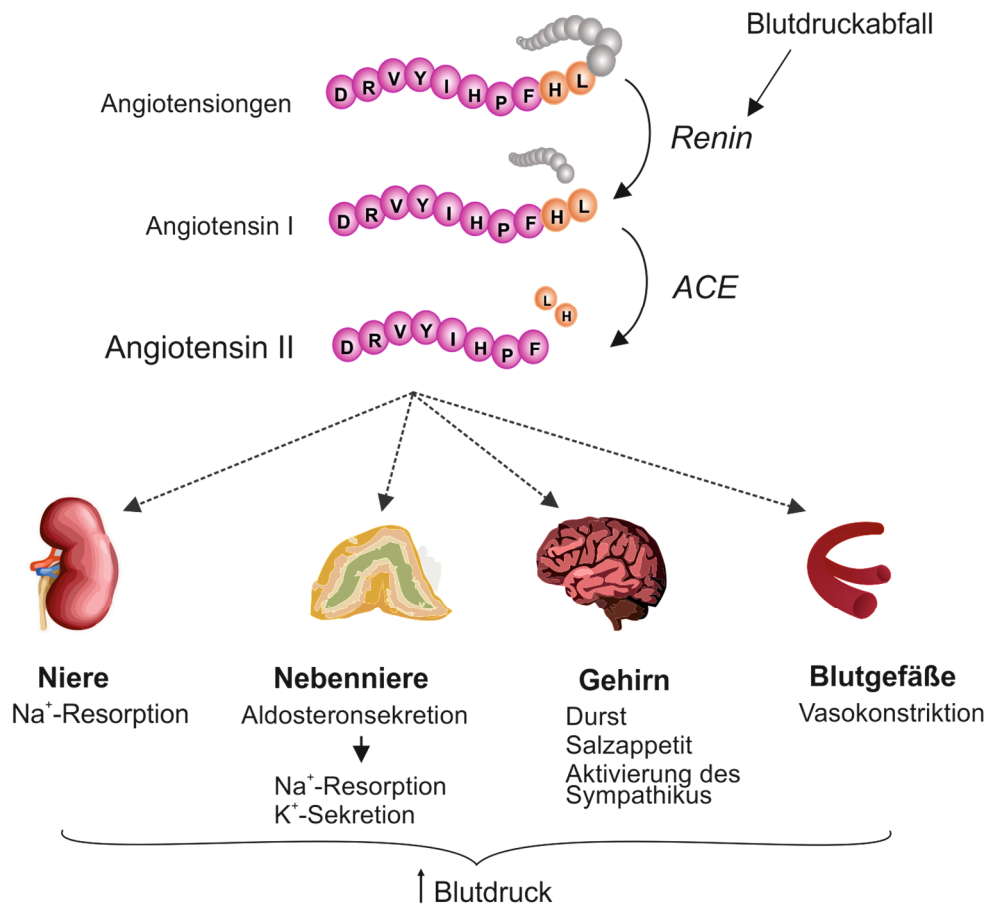


Abbildung 3: Das klassische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).

Das durch Blutdruckabfall sezernierte Renin führt zur Bildung von Angiotensin II (Ang II). Ang II stimuliert die Synthese von Aldosteron. Durch ihre Wirkung auf Herz, Blutgefäße, Niere, Nebenniere und Gehirn führen Ang II und Aldosteron zu einem Anstieg des Blutdrucks und somit über eine negative Rückkoppelung wiederum zu einer Reduktion der Reninfreisetzung.

Ein chronisch aktiviertes RAAS würde allerdings zu Schäden in Gefäßen, Herz und Nieren führen (Montani et al. 2004), daher reguliert das RAAS sich über einen negativen Feedback selbst: Der normalisierte Blutdruck und Salzhaushalt, aber auch Ang II direkt inhibieren die Reninsekretion aus den juxtaglomerulären Zellen und damit das RAAS (Abb. 3).

Zahlreiche weitere Mechanismen greifen in diesen Regelkreis ein. So werden Komponenten des RAAS auch außerhalb der „klassischen“ Organe gebildet, diese

lokalen RAAS (z. B. in der Niere, Gehirn, Fettgewebe und auch in den Nebennieren) beeinflussen die Aldosteronausschüttung (neben dem systemischen RAAS) zusätzlich auto- oder parakrin und führen dadurch zu erhöhten Aldosteronspiegeln in den einzelnen Geweben, vermutlich um dessen Wirkung gezielt lokal zu erhöhen (Paul et al. 2006). Ferner bewirkt ein zu großer Abfall des Plasma Na^+ die Ausschüttung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH), welches neben Ang II und K^+ in den Glomerulosazellen ebenfalls die Aldosteronsynthese stimuliert (Hattangady et al. 2012).

1.5. Zelluläre Regulation der Aldosteronsynthese

Die zelluläre Regulation der Aldosteronsynthese erfolgt in zwei Phasen. In der akuten Phase (bereits wenige Minuten nach Stimulationsbeginn) wird die Aldosteronsynthese über die Aktivierung von Signalkaskaden reguliert, welche zu einer erhöhten Verfügbarkeit zytologischen Cholesterins und über eine kurzfristige Aktivierung des StAR Proteins zu einem vermehrten Cholesterintransport in die Mitochondrien führen (Arakane et al. 1997; Cherradi et al. 1998). Bei langanhaltender Stimulation (Stunden bis Tage) geht die Aldosteronsynthese in eine chronische Phase über. Eine erhöhte Genexpression der beteiligten Enzymen, v. a. der CYP11B2, gewährleistet eine konstante Synthese des Mineralocorticoids (Bassett et al. 2004; Hattangady et al. 2012).

1.5.1. Kalium-induzierte Aldosteronsynthese

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bewirkt eine Erhöhung des extrazellulären K^+ die Stimulation der CYP11B2-Expression und der Aldosteronproduktion, schon eine K^+ -Erhöhung um 1 mM führt zu einer Verdoppelung der Hormonsynthese (Pralong et al. 1992). Diese einzigartige Sensitivität für extrazelluläres K^+ verleiht den Glomerulosazellen die Expression der konstitutiv geöffneten Hintergrund-Kaliumkanäle Task1 und Task3, welche das Ruhemembranpotenzial dieser Zellen maßgeblich bestimmen (Czirják et al. 2002; Lotshaw 2006; Brenner et al. 2008). Unter physiologischen Bedingungen haben die Zellen ein stark hyperpolarisiertes Membranpotenzial von etwa -80 mV (Quinn et al. 1987; Lotshaw 1997), welches fast dem Gleichgewichtspotenzial von K^+ entspricht. Bereits kleinste Veränderungen der intra- und extrazellulären K^+ -Homöostase führen zu einer Depolarisation der Zellmembran. Die durch eine Hyperkaliämie hervorgerufene Membrandepolarisation

führt durch die Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Levels (Abb. 4). Verantwortlich dafür sind sowohl T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, welche bei geringer Depolarisation öffnen, und L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, die erst bei einer stärkeren Depolarisation aktiviert werden. Unter physiologisch erhöhten K^+ -Konzentrationen scheinen hauptsächlich T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle für den Ca^{2+} -Einstrom verantwortlich zu sein. Bei supraphysiologischen K^+ -Konzentrationen hingegen inaktivieren die T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und der Einstrom erfolgt über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (Matsunaga et al. 1987; Cohen et al. 1988; Payet et al. 1994; Lotshaw 2001). Das intrazelluläre Ca^{2+} ist der wichtigste Mediator für die K^+ -induzierte Aktivierung der Aldosteronsynthese. So regte der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Levels durch den Ca^{2+} -Kanal-Agonist BAYK8644 die Expression der CYP11B2 mRNA an, die Hemmung dieser Kanäle durch Nifedipin hingegen inhibierte die durch Stimulation mit K^+ -induzierte CYP11B2 Expression (Denner et al. 1996). Downstream werden diese Effekte durch das Ca^{2+} -bindende Protein Calmodulin (CaM) und die darauffolgende Aktivierung der CaM Kinasen I und/oder IV (CamK I/IV) vermittelt (Rossier et al. 1996; Condon et al. 2002; Bassett et al. 2004). Diese Signalkaskade verursacht u. a. eine Steigerung der zellulären Cholesterinverfügbarkeit, die Phosphorylierung des StAR-Proteins und die Transkription des CYP11B2-Gens.

1.5.2. Regulation der Aldosteronsynthese durch Ang II

Ang II stimuliert die Aldosteronsynthese in Glomerulosazellen durch die Bindung an den membranständigen, G-Protein gekoppelten AT1-Rezeptor, welcher wiederum verschiedene Signalwege anregt.

Die Bindung des Hormons an den Rezeptor aktiviert das zytosolisch gebundene G-Protein (meist $\text{G}_{q/11}$), welches wiederum die Phosphoinositid-spezifische Phospholipase C (PLC) stimuliert. Durch die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4;5-bisphosphat (PIP2) durch die PLC werden zwei *second messenger* gebildet: Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1;4;5-trisphosphat (IP_3) (Barrett et al. 1989; Bollag et al. 2002; Bird et al. 1993; Hunyady et al. 1990). Letzteres führt über die Bindung an IP_3 -sensitive Kationenkanäle im endoplasmatischen Retikulum (ER) zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER und einer Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+} -Levels. Zur Aufrechterhaltung eines konstant erhöhten Ca^{2+} -Levels wird zusätzlich der Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran aktiviert: Zum einen ein kapazitativer Ca^{2+} -Einstrom über Store-Operated- Ca^{2+} -Channels (SOC), welche durch die Entleerung des ER angeregt werden (Ely et al. 1991; Burnay et al. 1994; Rohács et al. 1994; Spät et

al. 2004). Zum anderen über die Aktivierung spannungsabhängiger T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle über eine Senkung der Aktivierungsschwelle dieser Kanäle und der Depolarisation der Plasmamembran (Cohen et al. 1988; Ganguly et al. 1994; Payet et al. 1994; Rossier et al. 1996; Chen et al. 1999). Diese Depolarisation entsteht durch die parallel verlaufende Inhibierung der K^+ -Kanäle der TASK-Familie (Brauneis et al. 1991; Czirják et al. 2002; Wilke et al. 2014) und der Na^+/K^+ -ATPase (Hajnóczky et al. 1992; Yingst et al. 1999; Shah et al. 1999).

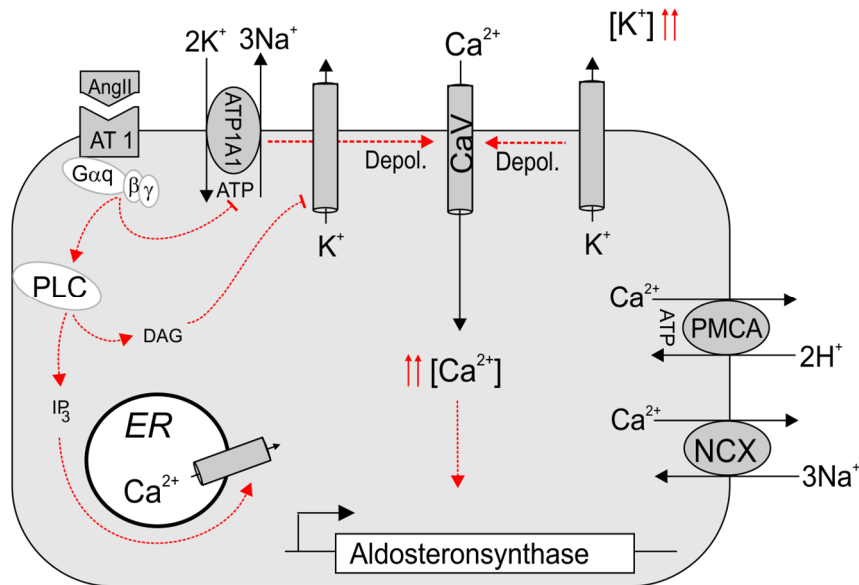


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Angiotensin II- und K^+ -induzierten Ca^{2+} -Erhöhung in Glomerulosazellen. Sowohl Angiotensin II (Ang II) als auch erhöhtes K^+ aktivieren spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (CaV), über die Depolarisation der Plasmamembran. Ang II induziert zusätzlich die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Das erhöhte Ca^{2+} aktiviert die Transkription des CYP11B2-Gens. Um einen Ca^{2+} -Überschuss in der Zelle zu verhindern, wird es über Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) aus dem Zytosol exportiert. Weitere Abkürzungen: AT1: Ang II Rezeptor Typ1; ATP1A1: Na^+/K^+ -ATPase; $\text{G}\alpha\text{q}/\beta\gamma$: $\alpha/\beta/\gamma$ Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins Typ q.

Das gesteigerte Ca^{2+} -Level ist essentiell für eine kontinuierliche Aldosteronfreisetzung durch Ang II, eine Stimulation unter extrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen bewirkt sogar einen Abfall der Hormonproduktion (Spät 1988; Kojima et al. 1985). Ähnlich wie bei einer Stimulation mit K^+ bindet das Ca^{2+} an Calmodulin (CaM), welches die CaM Kinasen I und IV aktiviert. Durch die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren

durch diese Kinasen wird die Expression des CYP11B2-, HSD3B2- und des StAR-Gens reguliert.

Allerdings inhibiert die Blockade des CaM/CaMK-Wegs die durch Ang II hervorgerufenen Effekte nicht komplett, was darauf schließen lässt, dass auch CaMK-unabhängige Signalwege stimuliert werden (Pezzi et al. 1997). Eine dieser Signalkaskaden wird durch die von DAG aktivierte Proteinkinase C (PKC) und deren Substrat der Proteinkinase D (PKD) vermittelt. PKC und PKD aktivieren über den MAPK/ERK Signalweg das „cAMP-response-element (CRE)-binding protein“ (CREB), welches zur Phosphorylierung und Transkription des StAR-Proteins führt (Stocco et al. 2005; Manna et al. 2003; Brose et al. 2002) und somit die Aldosteronsynthese antreibt. Ein weiterer Signalweg verläuft über die Phospholipase D (PLD) und den 12-Lipoxygenase Signalweg. Stimulation von Glomerulosazellen mit PLD induzierte unabhängig von einer Phosphoinositolhydrolyse, die Sekretion von Aldosteron, ein Hinweis darauf, dass PLD selbst die Aldosteronsynthese anregen kann (Bollag et al. 1990; Gu et al. 2003), vermutlich über den Downstream Effektor 12-Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE) (Natarajan et al. 1988). Darüber hinaus wird eine mögliche Rolle der Tyrosinkinase Src bei der Ang II-induzierten Aldosteronsynthese diskutiert (Sirianni et al. 2001). Einen Überblick über die verschiedenen durch den AT1-Rezeptor aktivierten Signalwege gibt Abb. 5.

Die Expression von CYP11B2 wird hauptsächlich über die Aktivierung der folgenden Transkriptionsfaktoren reguliert: NGFIB (nerve growth factor induced clone B) und NURR1 (Nuclear receptor related factor 1) sind Transkriptionsfaktoren, welche an zwei spezifische Bindestellen am CYP11B2-Promoter binden (dem NBRE-1 und Ad5) und deren Expression durch CaMK reguliert wird (Lu et al. 2004; M. H. Barrett et al. 2004; Nogueira et al. 2009; Romero et al. 2010). Ferner aktivieren CaMK weitere Transkriptionsfaktoren über Phosphorylierung, darunter sind ATF1 (activating transcription factor 1) und CREB (cAMP response element-binding protein). Beide binden an CRE, eine Sequenz, die ebenfalls auf dem Promoter der CYP11B2 identifiziert wurde (Clyne et al. 1997; Nogueira et al. 2010; Hattangady et al. 2012). Der Transkriptionsfaktor SF-1 (steroidogenic factor 1) ist als Inhibitor der CYP11B2 Transkription für die Regulation der Steroidsynthese von Wichtigkeit (Bassett et al. 2002; Ouyang et al. 2011).

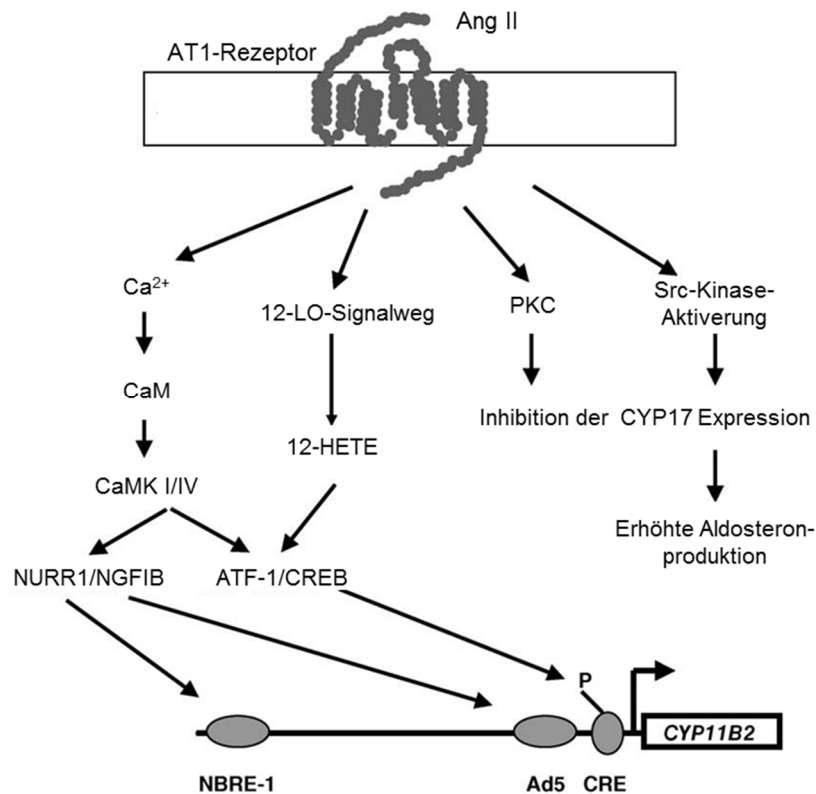


Abbildung 5: Verschiedene Signalwege zur Regulation der Aldosteronsynthese durch Ang II. Durch die Bindung an den AT1-Rezeptor aktiviert Ang II diverse intrazelluläre Signalwege, welche die Expression der CYP11B2 beeinflussen. Zum einen werden die Transkriptionsfaktoren der CYP11B2 (NURR-1/NGFIB; ATF-1/CREB) direkt reguliert: Durch die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von CaM-Kinasen stimuliert und Ca^{2+} -unabhängig über die Aktivierung des 12-Lipoxygenase-Signalweges (12-LO). Zum Anderen bewirkt Ang II die erhöhte Aldosteronsynthese über die Inhibition der CYP17-Regulation durch die Phosphokinase C (PKC) und die Aktivierung des Src-Kinase-Signalwegs. (Abb. abgeändert aus Bassett et al. 2004).

1.6. Bedeutung der Na^+/K^+ -ATPase für die Aldosteron-synthese

1.6.1. Das Transportprotein Na^+/K^+ -ATPase

Die Na^+/K^+ -ATPase, auch Na^+ -Pumpe genannt, ist ein membranständiges Protein und besteht in der Regel aus zwei Untereinheiten, der katalytischen α -Untereinheit und der stark glykosylierten β -Untereinheit, welche zusammen das aktive Transportprotein bilden (s. Abb. 6). Es gibt vier Isoformen der α -Untereinheit (α 1-4) und drei der β -Untereinheit (β 1-3) in Säugern. Die α 1-Isoform wird in allen Geweben exprimiert und durch das ATP1A1 Gen codiert. Die α -Untereinheit besteht aus 10

Transmembrandomänen (M1-M10), von denen sich M1-M8 in der Membran paarweise gegenüberstehen. Die β -Untereinheit besteht aus einer Transmembrandomäne, interagiert mit der α -Untereinheit an dem extrazellulären Loop zwischen M7-M8 und ist essentiell für die Translokation des Heterodimers zur Plasmamembran und der Kationenaffinität der Na^+/K^+ -ATPase. Obwohl die β -Untereinheit keine Enzym- oder Transportfunktion besitzt, ist deren Dimerisierung mit der α -Untereinheit essentiell für die ATPase- und Pumpaktivität des Proteins (Eakle et al. 1994; Xie et al. 1996; Kaplan 2002; Nyblom et al. 2013).

Die Na^+ -Pumpe gehört zu der Familie der P-Typ ATPasen, welche durch die Übertragung eines Phosphats von ATP auf das Protein die zum Ionentransport benötigte Energie gewinnt. Durch die ATP-Hydrolyse ändert sich die Konformation des Proteins, von der nach innen geöffneten E1- zur nach außen geöffneten E2-Konformation, mit deren phosphorylierten Intermediaten E1-P und E2-P. Während des Transportzyklusses werden 3 Na^+ -Ionen aus dem Zytosol heraus und 2 K^+ -Ionen in das Zytosol hinein gepumpt. In der E1-Konfiguration bindet sie intrazelluläres Na^+ , durch die darauf folgende Hydrolyse von ATP zu ADP (E1-P-Konformation) wird Na^+ zur extrazellulären Seite der Membran transportiert. Nach dem Abspalten des ADP öffnet sich die ATPase zum Extrazellularraum hin und die Na^+ -Ionen verlassen das Protein. In der E2-P-Konformation wird extrazelluläres K^+ gebunden, welches bei dem Übergang in die E1-Konformation, nach Abspaltung des Phosphates, in das Zytosol transportiert wird. Nach erneuter Bindung von ATP wird K^+ zytosolisch freigesetzt und der Zyklus beginnt von neuem (Post et al. 1972). Die Na^+/K^+ -ATPase verbraucht 20-30 % des zellulär produzierten ATPs, um Na^+ und K^+ entgegen ihrer Gradienten zu transportieren (Rolfe et al. 1997).

Erst vor kurzem konnten über Kristallstrukturanalysen die Ionenbindestellen den Transmembrandomänen M4-M6 zugeordnet werden, genauer gesagt ist deren Interaktion essentiell für die Ionenbindung. Vergleichende Kristall-Struktur-Analysen an eng verwandten Ca^{2+} -ATPasen lassen vermuten, dass die M1 Domäne Einfluss auf die Ionenbindung hat und somit von wesentlicher Bedeutung für die Pumpfunktion der ATPase ist (Sánchez et al. 2004; Ogawa et al. 2009; Shinoda et al. 2009; Einholm et al. 2007; Nyblom et al. 2013).

Durch den konstanten Transport von Na^+ und K^+ ist die Na^+/K^+ -ATPase der wichtigste Regulator zur Aufrechterhaltung des transmembranen Na^+ -Gradienten und der intrazellulären K^+ -Homöostase. Der Na^+ -Gradient wiederum ist eine wichtige Triebkraft für diverse für Co- und Antiportproteine, welche Na^+ -abhängig den transmembranen Transport von z.B. Glukose, Aminosäuren, Ca^{2+} - und H^+ -Ionen bewirken. Außerdem

wirkt die Na^+ -Pumpe indirekt durch den Aufbau des K^+ -Gradienten und direkt durch den elektrogenen Ionentransport hyperpolarisierend auf das Ruhemembranpotenzial einer Zelle (Gadsby et al. 1985). Die Na^+ -Pumpe dient zudem als Rezeptor für Herzglycoside wie z. B. Ouabain (Ling et al. 1972; Schwartz et al. 1982; Fedorova et al. 1997). Bisher ging man davon aus, dass Ouabain lediglich ein Inhibitor der Na^+/K^+ -ATPase ist, aber verschiedene Studien sprechen dafür, dass Ouabain über die Na^+/K^+ -ATPase auch intrazelluläre Signalwege anregen kann und dies bereits in Konzentrationen, welche noch nicht zu einer Hemmung der Pumpe führen (Liu et al. 2000; Xie 2003; Harwood et al. 2005; Y. Chen et al. 2008; Cherniavsky-Lev et al. 2014). Es wird vermutet, dass die Bindung von Ouabain die an die Na^+ -Pumpe gekoppelte Tyrosinkinase Src aktiviert und so diesen Signalweg antreibt (Haas et al. 2002; Yuan et al. 2005; Li et al. 2009). Die Pumpfunktion und die Src-Bindung werden über verschiedene Domänen des Proteins gesteuert und funktionieren unabhängig voneinander (Lai et al. 2013).

1.6.2. Rolle der Na^+/K^+ -ATPase bei der Aldosteronregulation

In Glomerulosazellen ist die Expression der Na^+/K^+ -ATPase verstärkt zu detektieren (Beuschlein et al. 2013) und die Pumpaktivität der Na^+/K^+ -ATPase trägt zudem einen wesentlichen Anteil am Membranpotenzial. Wie bereits vorher beschrieben, weisen diese Zellen auf Grund der K^+ -Leckströme ein stark hyperpolarisiertes Potenzial von -80 mV auf, eine Blockade der Na^+ -Pumpe durch den spezifischen Blocker Ouabain depolarisierte das Potenzial um 20-30 mV (Matthews et al. 1973; Natke et al. 1979). Weitere Studien konnten einen kausalen Zusammenhang zwischen der Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase und einer gesteigerten Aldosteronproduktion nachweisen. Die akute Inhibierung durch Ouabain führte innerhalb von 60 min zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} und zu einer erhöhten Aldosteronsekretion in Glomerulosazellen der Ratte. Dieser Ca^{2+} -Anstieg war Nifedipin-sensitiv, wurde also durch die Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle hervorgerufen, desweiteren blieb die Aldosteronsekretion nach Hemmung der Ca^{2+} -Kanäle aus (Hajnoczky et al. 1992; Yingst et al. 1999).

Physiologisch ist die Na^+/K^+ -ATPase bei der Ang II induzierten Aldosteronsynthese involviert. So führt die Stimulation des AT1-Rezeptors neben der Hemmung der Kalium-Hintergrundkanäle zu einer Hemmung der Na^+ -Pumpe (s. Kapitel 1.5.2). Durch die resultierende Membrandepolarisation und dem folgenden Ca^{2+} -Einstrom ist die Na^+/K^+ -ATPase während Ang II-Stimulation wichtig für das Aufrechterhalten des

konstant erhöhten Ca^{2+} -Levels und dadurch für die Aldosteronsekretion (Spät et al. 2004). Über welchen Mechanismus der aktivierte AT1-Rezeptor zur Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase führt, kann nur vermutet werden erste Studien weisen auf eine Phosphorylierung des Proteins hin, welche die Pumpfunktion inhibiert (Shah et al. 1999; Yingst et al. 2000).

1.7. Primärer Hyperaldosteronismus (PHA)

Als primären Hyperaldosteronismus bezeichnet man eine autonome Aldosteronsekretion unabhängig von Hyperkaliämie oder einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems. Das Krankheitsbild wurde 1955 erstmals von Jerome Conn beschrieben, daher wird PHA auch häufig als Conn-Syndrom bezeichnet. Als klassische Leitsymptome schilderte Conn: arterielle Hypertonie, Hypokaliämie und metabolische Alkalose (Conn & Louis 1956). Damals ging man von einer PHA Prävalenz von weniger als 1 % aus, jedoch wurden zu dieser Zeit Hypertoniepatienten lediglich auf PHA untersucht, wenn sie ebenfalls eine Hypokaliämie aufwiesen. Anfang der 90er Jahre erkannte man, dass PHA in den meisten Fällen normokaliämisch verläuft und es wurde die Plasma Aldosteron/Renin-Ratio zur Identifikation eines PHA eingeführt (Hiramatsu et al. 1981; Benchetrit et al. 2002). Ein erhöhtes Plasma-Aldosteron und eine erniedrigte Plasma-Reninaktivität sind ein Indiz für PHA. Mit der Veränderung des Screening-Verfahrens zeigte sich, dass PHA die häufigste Ursache für sekundäre Hypertonie ist. Heute schätzt man die Prävalenz von PHA auf 3-15 % in allen Hypertoniepatienten, in Deutschland allein entspricht dies etwa 1,2 Millionen Menschen mit PHA (Stowasser et al. 2004; Douma et al. 2008; Schirpenbach et al. 2009; Piaditis et al. 2015).

Neben dem PHA steht der sekundäre Hyperaldosteronismus, ihm liegen extra-adrenale Erkrankungen z. B. Renin-sezernierende Tumore (Unger et al. 2004; Gottardo et al. 2010) oder Herzinsuffizienz zu Grunde, welche das RAAS aktivieren. Patienten mit sekundärem Hyperaldosteronismus haben sowohl ein erhöhtes Plasma-Aldosteron als auch eine erhöhte Plasma-Reninaktivität (Seiler et al. 2003).

1.7.1. Pathophysiologie des PHA

Das markanteste Symptom des Conn-Syndroms ist die exzessive Aldosteronsekretion, welche unabhängig von Blutdruck, Plasmavolumen und dem Plasmalevel von Na^+ und K^+ auftritt. Auf Grund seiner mineralocorticoiden Funktion bewirkt das chronisch erhöhte Aldosteron die Sekretion von K^+ , welche einhergeht mit der Ausscheidung von

H⁺-Ionen der vermehrten Reabsorption von Bikarbonat und resultiert in einer metabolischen Alkalose. Die gesteigerte Retention von Na⁺ und Wasser führt zu Hybernatriämie und Hypertonie, gefolgt von einer Inhibition der Reninsekretion und der Angiotensin II-Synthese. Die Plasmalevel von Na⁺ und K⁺ sind allerdings häufig im Normalbereich, da der Körper in der Lage ist, die starke Kaliurese und Na⁺-Retention über kompensatorische Mechanismen in der Niere zu verhindern (August et al. 1958; Hall et al. 1984; Gonzalez-Campoy et al. 1989).

Wie in Kapitel 1.3. angesprochen, hat Aldosteron, unabhängig von der assoziierten Hypertonie, *per se* auch negative Effekte auf das renale und kardiovaskuläre System und begünstigt das Auftreten von Endorganschäden in Patienten mit Conn-Syndrom. Vergleichende Studien zwischen Patienten mit PHA und mit essentieller Hypertonie ergaben, dass Patienten mit PHA häufiger unter linksventrikulärer Hypertrophie, Myokardinfarkt, Vorhofflimmern und Schlaganfall litten (Mulatero et al. 2013; Nishimura et al. 1999; Abad-Cardiel et al. 2013). Nachgewiesen wurden diese Zusammenhänge durch zwei große Schlüsselstudien (Randomised Aldactone Evaluation Study (RALES) (Pitt et al. 1999)- und EPlerenone Heart failure and SURvival Study (EPHESUS) (Pitt et al. 2003)): Die Behandlung von hypertonen Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz durch MR-Blocker reduzierte deren Mortalität und Hospitalisierungsrate. Des Weiteren wiesen Patienten mit PHA eine verstärkte glomeruläre Filtrationsrate und eine gesteigerte Ausscheidung von Albumin auf, was auf eine renale Dysfunktion hinweist. Auch diese Effekte konnten durch MR-Antagonisten verringert werden (Ribstein et al. 2005; Wu et al. 2011).

Die Hauptursachen für PHA sind die bilaterale adrenale Hyperplasie und Aldosteron-produzierende Adenome (APA), zusammen treten sie in 95 % der Fälle auf. Weniger häufige Subtypen sind die unilaterale adrenale Hyperplasie, Aldosteron-produzierende Karzinome und hereditäre Formen des PHA (Young 2007). Hereditäre Formen des PHA werden in drei Subtypen unterschieden: Familiärer Hyperaldosteronismus (FH) Typ I, Typ II und Typ III. Der FH Typ I basiert auf einem Crossover des CYP11B1- und CYP11B2-Gens, somit unterliegt die CYP11B2-Codierungsregion der CYP11B1-Promoteraktivität. Die Aldosteronsynthese wird dadurch hauptsächlich über ACTH reguliert (Lifton et al. 1992) und kann durch Glukocorticoidgabe supprimiert werden. Die genetische Ursache für FH Typ II ist noch nicht ganz aufgeklärt, man vermutet Veränderungen in der chromosomalen Region 7p22 (So et al. 2005; Sukor et al. 2008). Erst vor wenigen Jahren wurde der FH Typ III definiert, hier ist eine Mutation des Kaliumkanals KCNJ5 und des Ca²⁺-Kanals CACNA1D ursächlich für den PHA (Geller et al. 2008; Choi et al. 2011; Scholl et al. 2013).

Die bilaterale adrenale Hyperplasie ist der am häufigsten diagnostizierte Subtyp. Sie ist verantwortlich für etwa 50-70 % der Erkrankungen und entsteht oft ohne erkennbaren Grund, weshalb sie auch als idiopathischer Hyperaldosteronismus bezeichnet wird (Mulatero et al. 2013).

In 30-50 % der Patienten ist ein APA, auch Conn-Adenom genannt, die Ursache für exzessive Aldosteronausschüttung. Im Vergleich zur bilateralen adrenalen Hyperplasie sind Patienten bei Diagnosestellung häufig jünger, haben tendenziell niedrigere Kaliumspiegel und einen stärkeren Hypertonus (Ganguly 1998; Blumenfeld et al. 1994). Morphologisch zeigen sich Conn-Adenome heterogen, bestehen also zu verschiedenen Anteilen aus glomerulosa-, fasciculata- und reticularis-ähnlichen Zellen, häufig weisen Zellen auch Eigenschaften mehrerer Zelltypen auf (Boukroun et al. 2011; Azizan et al. 2013; Dekkers et al. 2014; Monticone et al. 2015). In den letzten Jahren konnten in etwa der Hälfte der APAs somatische Punktmutationen ausgemacht werden (Fernandes-Rosa et al. 2014), welche zur autonomen Synthese von Aldosteron führen und eventuell auch zur Adenomenstehung beitragen. APA-assoziierte Mutationen wurden bisher in folgenden Genen identifiziert: KCNJ5 (K⁺-Kanal Kir 3.4), CACNA1D (α -Untereinheit des L-Typ Ca²⁺-Kanals CaV 1.3), CTNNB1 (β -Catenin), ATP2B3 (PMCA3) und ATP1A1 (α 1-Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase) (Choi et al. 2011; Monticone et al. 2013; Azizan et al. 2013; Scholl et al. 2013; Beuschlein et al. 2013; Cheng et al. 2014; Williams et al. 2014).

1.7.2. Mutationen der Na⁺/K⁺-ATPase als Ursache für PHA

Dass Mutationen in der α 1-Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase zur Entstehung von APAs beitragen, ist erst seit wenigen Jahren bekannt. Beuschlein *et al.* zeigten dies erstmals im Jahr 2013: durch Exom-Sequenzierung von APAs einer Patientenkohorte in München stellten sie fest, dass 6,8 % der APAs Mutationen im ATP1A1-Gen aufwiesen. Keimbahnmutationen von ATP1A1 wurden nicht gefunden (Beuschlein et al. 2013). Kurz darauf identifizierten Azizan et al. 2013 weitere Mutationen der ATP1A1 in einer englischen Kohorte. In einer europaweiten Studie durch das *European Network for the Study of Adrenal Tumours* (ENS@T) wurden die Daten mehrerer Kohorten verglichen und es wurden in 5,3 % der analysierten APAs somatische Mutationen in dem ATP1A1-Gen nachgewiesen. Die Prävalenz der Mutation schwankte dabei kaum zwischen den einzelnen Kohorten (Fernandes-Rosa et al. 2014).

Morphologisch scheinen Adenome mit ATP1A1-Mutationen hauptsächlich aus Glomerulosa- und weniger aus Fasciculatazellen zu bestehen und sind mit 1-10 mm Durchmesser relativ klein (Azizan et al. 2013; Monticone et al. 2015), diese Befunde waren aber nicht in allen Studien übereinstimmend (Beuschlein et al. 2013; Williams et al. 2014). Die Proteinexpression der Na⁺/K⁺-ATPase im Adenom war nicht verändert im Vergleich zum umgebenden adrenalen Gewebe (Beuschlein et al. 2013), allerdings wiesen die Adenome eine vermehrte CYP11B2-Expression auf (Williams et al. 2014). Die Mutationen L104R, V332G und G99R in der α -Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase führten zu einem Verlust der ATPase-Aktivität und somit der Transportfähigkeit von Na⁺ und K⁺. Nichtsdestotrotz konnten die Proteine weiterhin ATP binden und wiesen eine Na⁺-abhängige Phosphorylierung auf, allerdings waren die Affinitäten für Na⁺ und K⁺ stark reduziert (Beuschlein et al. 2013; Williams et al. 2014). Für die Ionenbindung ist v. a. die Lokalisation des Aminosäurerestes von Glu334 in der Transmembrandomäne M4 wichtig, dessen Position essentiell durch Leu104 in der M1 beeinflusst wird (Ogawa et al. 2002; Einholm et al. 2007). Da die Mutationen in der Nähe dieser Aminosäuren liegen (Abb. 6), wird vermutet, dass sie die Position des Glu334 modifizieren und dadurch die Ionenaffinität und die Eigenschaften der Porendomäne des Proteins verändern. Kopec *et al.* konnten dies durch Moleküldynamik-Simulationen zeigen: die Mutationen L104R und V332G verschieben den Aminosäurerest von Glu334, so dass die K⁺-Ionen nicht in der optimalen Position gebunden werden können. Die Konformationsänderung der Na⁺/K⁺-ATPase, um K⁺ über die Membran zu transportieren, wird dadurch verhindert (Kopec et al. 2014). Ein ähnlicher Mechanismus könnte bei der G99R Mutation vorliegen.

Sowohl primäre Kulturen aus humanen Adenomzellen als auch transfizierte HEK-293 Zellen mit einer ATP1A1 Mutation, hatten im Vergleich zu den Kontrollzellen ein depolarisiertes Membranpotenzial. Zudem führten die Mutationen in einer humanen adrenalen Zelllinie zur gesteigerten Expression der Aldosteronsynthese (Azizan et al. 2013; Williams et al. 2014). Azizan *et al.* zeigten jedoch, dass die Mutationen dem Protein eine zusätzliche pathologische Funktion („*gain-of-function*“) verleihen. Sie stellten in Oozyten von *Xenopus laevis* einen pathologischen Einwärtsstrom, hervorgerufen durch die mutierten Na⁺/K⁺-ATPasen, fest. Dieser Strom konnte durch erhöhtes extrazelluläres Na⁺ verstärkt werden, die Na⁺-induzierten Ströme waren jedoch unterschiedlich ausgeprägt in den betrachteten Mutationen. Des Weiteren war der Einwärtsstrom durch die L104R Mutation stark H⁺-abhängig (Azizan et al. 2013). Korrelierend dazu zeigten die Simulationen von Kopec *et al.*, dass die Mutation zu einer erhöhten Hydratisierung der Ionenbindedomäne führte.

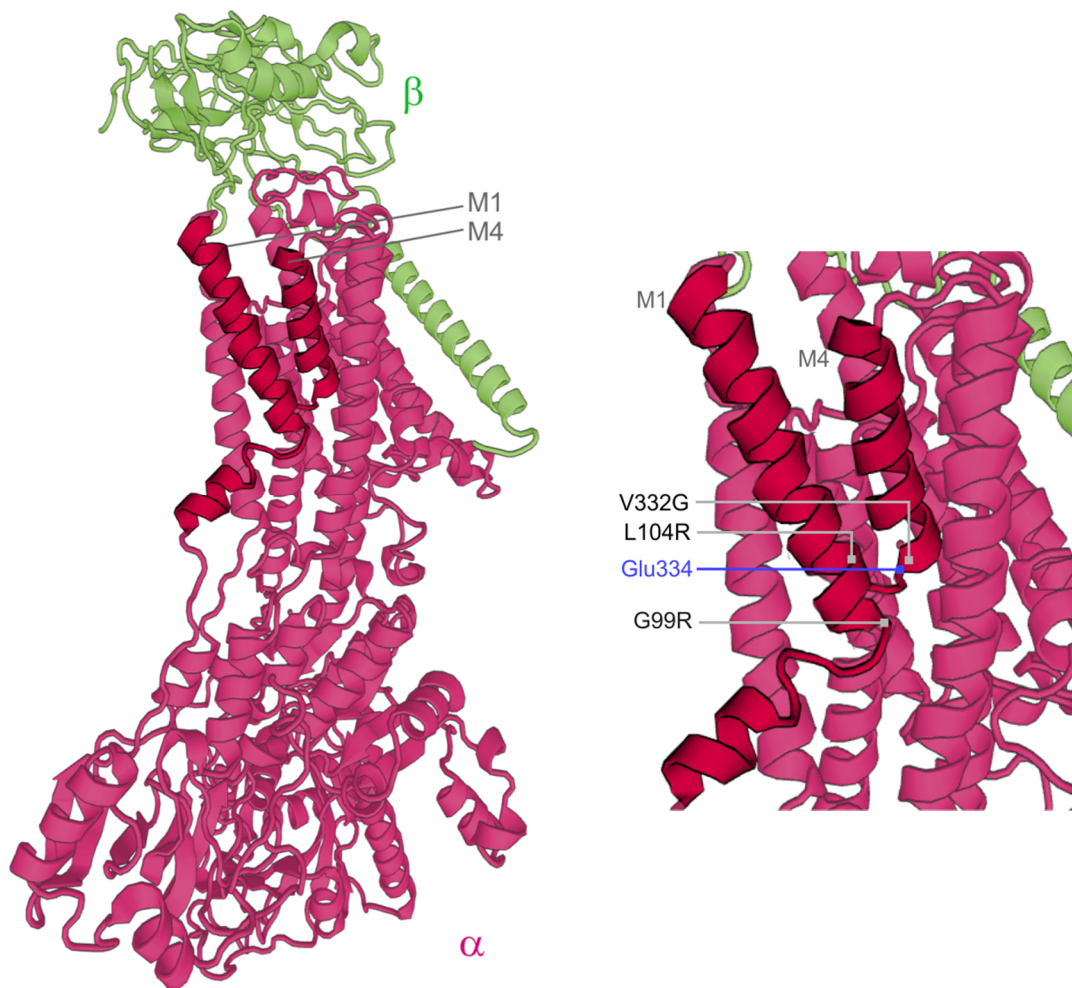


Abbildung 6: Strukturmodell der Na⁺/K⁺-ATPase, mit α- (magenta) und β- (grün)-Untereinheit. Dunkler hervorgehoben sind die Transmembranen M1 und M4, welche für die Ionenbindung von Bedeutung sind **(A)**. **(B)** Vergrößerung der transmembranen Einheit. Markiert wurden die Positionen der in dieser Arbeit analysierten APA-assoziierten Mutationen (hellgrau) und der für die Ionenbindung essentiellen Aminosäure Glu334 (blau). Struktur nach Shinoda et al. 2009.

1.8. Zielsetzung der Arbeit

Die aktuellen Studien fokussierten sich hauptsächlich auf die Effekte APA-assoziiierter ATP1A1-Mutationen auf die Proteinfunktion. Die Konsequenzen der ATP1A1-Mutationen für die Funktion der Nebennierenrindenzellen sind hingegen noch weitgehend unerforscht. Erste Studien wiesen ein depolarisiertes Membranpotenzial in Zellen mit ATP1A1-Mutationen nach. Dies führte zu der Hypothese, dass die Mutationen zu einem erhöhten Ca²⁺-Level führen und dadurch die CYP11B2-

Transkription und Aldosteronsynthese induzieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es dieser Hypothese nachzugehen und die pathologische Auswirkung der APA-assoziierten ATP1A1-Mutationen L104R, V332G und G99R auf die Zellphysiologie adrenaler Zellen genauer zu analysieren, um ein besseres Verständnis über die zellulären Mechanismen bei der Entstehung des primären Hyperaldosteronismus zu erhalten.

Zunächst wurde in einer Kollaboration mit Dr. Tracy Ann Williams (Division of Internal Medicine and Hypertension, Department of Medical Sciences, University of Torino, Torino) die Mutation G99R in HEK-Zellen elektrophysiologisch charakterisiert. Als nächstes wurde der Einfluss der Mutationen auf die adrenokortikale Zelllinie NCI-H295R im Detail bearbeitet. Dabei untersuchten wir, inwiefern die Mutationen die elektrophysiologischen Eigenschaften adrenaler Zellen beeinflussen und ob dies zu einer veränderten intrazellulären Ca^{2+} -Aktivität führt. Des Weiteren prüften wir, welche Auswirkungen der vermutete H^+ -Leckstrom der L104R auf die intrazelluläre pH-Regulation hat und welche Rolle der pH bei der Aldosteronsynthese spielt.

KAPITEL 2

MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Benchmark Microplate-Reader	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
DMZ Universal Puller	Zeitz Instruments GmbH, Martinsried, D
Flammenphotometer PFP7	Jenway, Stone, UK
Light Cycler LC480	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D
NanoDrop™ 3300	Thermo Scientific, NanoDrop products, Wilmington, NC, USA
Neon® Transfection System	Invitrogen/Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Verstärker EPC-10	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, D

2.1.2. Substanzen

Acrylamid	Roth, Karlsruhe, D
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, D
Angiotensin II	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
ATP Na ₂	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA

BSA	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
CaCl ₂	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, D
Cariporid	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, D
Collagen from calf skin solution	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
D-Kaliumgluconat	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
D-Mannitol	Fluka Chemie GmbH, Buchs, D
DynaBeads CD8	Invitrogen/Life Technologies Ltd., Paisley, UK
EGTA	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
FCS	Gibco Cell Culture Systems, Invitrogen, Karlsruhe, D
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, D
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, D
HCl (32 %)	Merck KGaA, Darmstadt, D
HEPES	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Bovine fibronectin	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
K ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, D
KCl	Merck KGaA, Darmstadt, D
KH ₂ PO ₄ * 3H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, D
MgCl ₂ * 6H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumdesoxycholat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, D
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, D
NaH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, D
NaN ₃	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, D
NMDG	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
OptiMEM	Invitrogen/Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Ouabain	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, D
Penicillin-Streptomycin	1000 I.E./ml Pen G, 10000 µg/ml Strep.-Sulfat; Gibco Cell Culture Systems, Invitrogen, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt, D
TEMED	Roth, Karlsruhe, D
Tris	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Triton-X-100	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA-Lösung (10x)	0,5 % Trypsin, 5,3 mM EDTA, Gibco Cell Culture Systems, Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.3. Enzyme und Kits

Aldosteron-ELISA	IBL International GmbH, Hamburg, D
Bradford-basierter Protein-Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
DNAse I	QIAGEN, Hilden, D
dNTP-Mix	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Laemmli-Probenpuffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Lipofectamine® 2000/3000	Invitrogen/Life Technologies Ltd., Paisley, UK
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
M-MLV RT Puffer (5x)	Promega Corporation, Madison, WI, USA
NucleoSpin® RNA Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D
Random Hexamer Primer (100 µM)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
RNAse Inhibitor	Promega Corporation, Madison, WI, USA
SYBR®Green PCR Kit	QIAGEN, Hilden, D
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, D

2.1.4. Oligonukleotide

Symbol	Primersequenz (3'-5')	Acc.No	T _A °C
ACTB	se CCAGAGGCGTACAGGGATAG as CCAACCGCGAGAAGATGA	NM_001101.3	57
HSD3B2	se CTTGGACAAGGCCTTCAGAC as TCAAGTACAGTCAGCTTGGTCCT	NM_000198.3	60
CYP11B2	se ACTCGCTGGGTCGCAATG as AGTGTCTCCACCAGGAAGTGC	NM_000498	61
NR4A2	se GCCTGGACTATTCCAGGTTC as GCCAGTCAGGAGATCATAGA	NM_006186.3	59
STAR	se TACGTGGCTACTCAGCATCG as GGACAGGACCTGGTTGATGA	NM_000349.2	60
CYP11A1	se AGGAGGGGTGGACACGAC as TTGCGTGCCATCTCATACA	NM_000781.2	59
CYP17A1	se CTATGCTCATCCCCACAAG as CCTTGTCCACAGCAAACCTCA	NM_000102.3	59
CYP21A1	se TCATCATTCCGAACCTCCA as GCTCCAGGAAGCGATCAG	NM_000500.5	59
CYP11B1	se GGCAGAGGCAGAGATGCTG as TCTTGGGTTAGTGTCTCCACCTG	NM_000497.3	62

SLC9A1	se CTGGGCATCGACTACACACA as CTCTCCGGGACGATGCTTG	NM_003047.4	60
--------	---	-------------	----

2.1.5. Lösungen und Puffer

Western Blot

Bezeichnung	Substanz	Endkonzentration
PBS-Puffer, pH 7,4	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
	Na ₂ HPO ₄	10,3 mM
	NaCl	137 mM
	in Aqua dest.	
RIPA-Lysepuffer	SDS	0,1 %
	Natriumdesoxycholat	0,5 %
	IGEPAL CA-630	1 %
	Protease Inhibitor Cocktail	1 mM
	PMSF	1 mM
	in PBS pH 7,4	
SDS-PAGE Trenngel (8 %)	Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	8 %
	1,5 M Tris (pH 8,8)	375 mM
	SDS (10 %)	0,1 %
	Ammoniumpersulfat (10 %)	0,1 %
	TEMED	0,06 %
	in Aqua dest.	
SDS-PAGE Sammelgel (5 %)	Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	5 %
	0,5 M Tris (pH 6,8)	62,5 mM
	SDS (10 %)	0,1 %
	Ammoniumpersulfat (10 %)	0,1 %
	TEMED	0,1 %
	in Aqua dest.	
SDS-PAGE Laufpuffer 5x, pH 8,3	Tris	124 mM
	Glycin	959 mM
	SDS	17,3 mM
	in Aqua dest.	

Transfer-Puffer (WB)	Methanol	200 mL
	5 x SDS-Page Laufpuffer	200 mL
	ad 1L mit Aqua dest.	
Antikörperversdünnungslösung (primärer AK für WB)	BSA	1,5 %
	NaN ₃	0,01 %
	Tween-20	0,1 %
	in PBS	
Antikörperversdünnungslösung (sekundärer AK für WB)	Trockenmilchpulver	1 %
	Tween-20	0,1 %
	in PBS	

Lösungen für die Messungen in Zellen transfiziert mit rAtp1a1

Bezeichnung	Substanz	mmol/l
1 x Kontrolllösung	HEPES	5
	NaCl	145
	K ₂ HPO ₄	1,6
	KH ₂ PO ₄	0,4
	Glucose	5
	pH 7,4 (eingestellt mit NaOH oder HCl)	
1 x Na⁺-freie Lösung	HEPES	5
	NMDG	145
	K ₂ HPO ₄	1,6
	KH ₂ PO ₄	0,4
	Glucose	5
	MgCl ₂	1
	CaCl ₂	1,3
	HCl (32 %)	145
	pH 7,4 (eingestellt mit NMDG oder HCl)	

15 mM K⁺-Lösung	HEPES	5
	NaCl	133,6
	KCl	11,4
	K ₂ HPO ₄	1,6
	KH ₂ PO ₄	0,4
	Glucose	5
	MgCl ₂	1
	CaCl ₂	1,3
	<u>pH 7,4 (eingestellt mit NaOH oder HCl)</u>	

50 mM K⁺-Lösung	HEPES	5
	NaCl	98,6
	KCl	46,4
	K ₂ HPO ₄	1,6
	KH ₂ PO ₄	0,4
	Glucose	5
	MgCl ₂	1
	CaCl ₂	1,3
	<u>pH 7,4 (eingestellt mit NaOH oder HCl)</u>	

Pipettenlösung	K ⁺ -Gluconat	95
	KCl	30
	NaH ₂ PO ₄	1,2
	Na ₂ HPO ₄	4,8
	Glucose	5
	MgCl ₂	2,38
	CaCl ₂	0,73
	EGTA	1
	ATP Na ₂	3
	<u>pH 7,2 (eingestellt mit KOH oder HCl)</u>	

Lösungen für die Messungen von mit hKCNJ5 transfizierten Zellen

Bezeichnung	Substanz	mmol/l
1 x Kontrolllösung	HEPES	10
	NaCl	140
	KCl	5
	Glucose	5
	MgCl ₂	1,8
	CaCl ₂	1,8
	pH 7,4 (eingestellt mit NaOH oder HCl)	
15 mM K⁺-Lösung	HEPES	10
	NaCl	130
	KCl	15
	Glucose	5
	MgCl ₂	1,8
	CaCl ₂	1,8
	pH 7,4 (eingestellt mit NaOH oder HCl)	

2.1.6. Expressionsvektoren

Zur funktionellen Analyse der Na⁺/K⁺-ATPase in humanen Zelllinien wurde die cDNA Sequenz der Ratte verwendet. Dieses Protein ist, im Gegensatz zum humanen Protein, nicht sensitiv gegenüber geringen Konzentrationen des Na⁺/K⁺-ATPase-Blockers Ouabain. Auf Grund dessen ist es möglich in Versuchen die endogene ATPase zu hemmen und die Funktion der mutierten ATPase genauer zu analysieren.

Plasmide (pMT2), welche die full-length cDNA Sequenz der α 1-Isoform der Na⁺/K⁺-ATPase (Atp1a1, Wildtyp und die Mutanten L104R, V332G) der Ratte enthielten, wurden von Bente Vilsen (Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark) zur Verfügung gestellt. Die Mutation G99R wurde über eine ortsspezifische Mutagenese in die Ratten-Atp1a1 cDNA eingefügt und in den Expressionsvektor einkloniert. Die verwendeten cDNA Sequenzen für den humanen KCN5^{WT} und KCN5^{L168R} wurden von GeneArt®/Invitrogen bezogen. Zur funktionellen Analyse in eukaryotischen Zellen wurden alle cDNAs in den bicistronischen,

eukaryotischen Expressionsvektor pIRES-CD8 (Fink et al. 1998) umkloniert. Das pIRES-CD8 Plasmid codiert, neben dem Zielgen, für das membranständige Protein CD8, welches als Transfektionskontrolle diente. Transfizierte Zellen wurden mit anti-CD8 gekoppelten Dynabeads markiert und konnten so unter einem Lichtmikroskop von nicht transfizierten Zellen unterschieden werden.

2.1.7. Rattenspezifischer anti-Na⁺/K⁺-ATPase Antikörper

Die humane und die Na⁺/K⁺-ATPase der Ratte weisen eine große Homologie auf. Aktuell stehen nur anti-Na⁺/K⁺-ATPase Antikörper auf dem Markt zur Verfügung, welche sowohl das humane Protein als auch das der Ratte erkennen. Wir haben uns daher entschlossen, einen für Ratten spezifischen Antikörper entwickeln zu lassen. Als Epitop wurde die Aminosäuresequenz „AYGIRSATEEEPPNDL“ gewählt, da diese den größten Unterschied zur humanen Sequenz aufweist. Die Immunisierung erfolgte für 5 Monate und wurde von der Firma Pineda (Pineda-Antikörper Service, Berlin) durchgeführt. Der gewonnene Antikörper erkennt die Na⁺/K⁺-ATPase der Ratte und auch der Maus und bindet nicht an das humane Protein. Allerdings hat der Antikörper unspezifische Bindestellen in humanen Zellen, daher wurde der AK nur für Proteinanalysen im Western Blot verwendet, für die Immunfluoreszenz wurde auf einen kommerziellen anti-ATP1A1 Antikörper (C 464.6; Millipore) zurückgegriffen.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur und Transfektion

Die zur heterologen Expression der Na⁺/K⁺-ATPase und der KCNJ5 cDNA verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche bis zur Konfluenz herangezogen und für die entsprechenden Versuche gesplittet. Entsprechend der Versuche wurden die Zellen auf Fibronectin/Kollagen-beschichteten Glasplättchen oder direkt in Zellkulturschälchen mit 9,6 cm² Wachstumsfläche ausgesät. Alle verwendeten Zellkultursubstanzen wurden, wenn im Text nicht anders erwähnt, von der Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Verwendet wurden HEK-293 Zellen (CLS, Eppelheim, Deutschland), welche in MEM alpha Medium, supplementiert mit 10 % FCS (Hitze-inaktiviert) und 100 I.E./ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin,

kultiviert wurden. Als adrenales Zellmodell wurde die aus einem Nebennierenrindenkarzinom stammende Zelllinie NCI-H295R verwendet (CLS, Eppelheim, Deutschland). Die Kultivierung erfolgte in einem zelllinienspezifischen Medium (mit 15mM HEPES, 6,25 µg/ml Insulin, 6,25 µg/ml Transferrin, 6,25 µg/ml Selen, 1,25 mg/ml BSA, 5,35 mg/ml Linolensäure, 2,5% Nu-Serum (MG-42, CLS, Eppelheim)), supplementiert mit 100 I.E./ml Penizillin und 100µg/ml Streptomycin.

2.2.1.1. Transfektion mit Lipofectamin™ 2000 und 3000

Die Zellen wurden 24 h vor der Lipofektion ausgesät ($1,5 \cdot 10^6$ Zellen pro $9,6 \text{ cm}^2$ Wachstumsfläche). Die Transfektion wurde 48 h vor dem Experiment nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Verwendet wurden jeweils 3 µg Plasmid pro $9,6 \text{ cm}^2$ Wachstumsfläche. Das Medium mit dem Transfektionsmix wurde nach 24 h durch frisches Kulturmedium ausgetauscht.

2.2.1.2. Transfektion von NCI-H295R Zellen durch Elektroporation

Die Zellen wurden 24 h oder 48 h vor Versuchsbeginn mit 5 µg Plasmid pro $1 \cdot 10^6$ Zellen für NCI-H295R Zellen und 1 µg Plasmid pro $8 \cdot 10^5$ für HEK-293 Zellen mit dem NEON® Elektroporationssystem transfiziert. Die Elektroporation wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, das Pulsprotokoll wurde zuvor auf die jeweiligen Zelllinien optimiert: für NCI-H295R Zellen: 1 Puls, 40 ms, 1100 V. Für HEK-293 Zellen: 2 Pulse, 20 ms, 1150 V.

2.2.2. Western Blot

2.2.2.1. Proteinisolation

48 h nach Transfektion mit Lipofectamin™ 3000 wurden die Zellen mit RIPA-Lysepuffer aufgeschlossen. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, anschließend mit 200 µl des RIPA-Lysepuffers aufgeschlossen und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Überführung in ein Eppendorfcup, wurde das Zelllysate mit einer 25 G Kanüle homogenisiert und bei 11.000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Proteinkonzentration mittels Bradfordassay bestimmt. Die Proben wurden bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.2. SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine im Zelllysate erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE nach Laemmli. Für die SDS-PAGE wurde ein 5-%iges Sammelgel und ein 8-%iges Trenngel verwendet. Die Proben wurden direkt vor der Elektrophorese im Verhältnis 1:3 mit Laemmli-Probenpuffer versetzt. Pro Geltasche wurden 200 µg der NCI-Zelllysate aufgetragen, als Positivkontrolle diente Protein aus der Niere einer Ratte. Der Gellauf wurde in Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel für 40 min durchgeführt.

2.2.2.3. Proteintransfer und Immunodetektion

Die Proteine wurden anschließend mit der semidry-Methode mit Transferpuffer für 1,5 h bei 100 mA pro Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde auf Höhe des 55 kDa Markers geteilt. Der untere Teil wurde zunächst 1h mit einer 5-%igen Milchlösung in PBS-Tween (PBS mit 0,1 % Tween-20) geblockt, nach dreimaligem Waschen für 5 Min in PBS-Tween mit dem primären Antikörper gegen β -Aktin (1:500 verdünnt) über Nacht bei 4 °C hybridisiert. Der obere Teil der Membran wurde direkt nach dem Proteintransfer 3x mit PBS-Tween gewaschen und ohne zu blockieren mit der primären AK-Lösung gegen die murine Na^+/K^+ -ATPase (Verdünnung: 1:1000; s. Kapitel 2.1.7) über Nacht bei 4 °C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde der primäre AK abgenommen, die Membran nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween mit einem HRP-konjugierten sekundären AK (donkey anti-rabbit; Verdünnung 1:5000; Santa Cruz Biotechnology) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS-Tween wurde der Blot mit ECL Reagenz inkubiert und mit dem Fusion FX7™ Multi-Imagingsystem (PeqLab) entwickelt.

2.2.3. Immunfluoreszenzfärbung transfizierter NCI-H295R Zellen

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen elektroporiert und auf Glasplättchen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Ringerlösung gewaschen und für 3 min in Ringerlösung mit anti-CD8-Dynabeads (1 µl/ml) geschwenkt, um später die transfizierten von den untransfizierten Zellen unterscheiden zu können. Nach Abwaschen der Dynabeads wurden die Zellen für 10 min mit eiskühlem Methanol (100 %) bei -20 °C fixiert und permeabilisiert, danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindestellen für den sekundären Antikörper in der Zelle abzusättigen, wurden die Zellen für 10 min in einer Lösung mit

5 % BSA in PBS inkubiert. Nachdem diese „Blockierlösung“ abgewaschen war, wurden die Zellen für 4 h mit dem primären anti-ATP1A1 Antikörper (Millipore C464.6) bei Raumtemperatur inkubiert (Verdünnung: 1:500 in PBS mit 0,5 % BSA). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 1 h im Dunklen mit der Sekundär-Antikörperlösung gefärbt (Sekundär-Antikörper 1:400, Hoechst 33342 5 µM in PBS mit 0,5 % BSA). Das Deckgläschen wurde zum Schluss mit PBS gewaschen und anschließend mit Mounting Medium (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D) auf einem Objektträger fixiert. Für die Immunfluoreszenz wurde der anti-ATP1A1 Antikörper von Millipore verwendet, da der rattenspezifische AK unspezifische Bindestellen in humanen Zellen aufwies.

2.2.4. Genexpressionsanalyse

2.2.4.1. RNA-Isolation und reverse Transkription

Gesamt-RNA aus Lysaten von NCI-H295R Zellen wurde nach Herstellerprotokoll mit dem NucleoSpin® RNA Kit isoliert und in RNase-freiem ddH₂O eluiert. Die RNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert. Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch mit Hilfe des Nanodrop 3000 bestimmt und die Integrität der RNA auf einem Agarosegel (1 %) analysiert. Für die cDNA-Synthese wurden 1 µg RNA mit 1 µl Random Hexamer Primer (100mM) versetzt und mit nucleasefreiem Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 5 min auf 70 °C erhitzt und anschließend wieder auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 0,5 mM dNTP's, 20 U Ribonuklease Inhibitor (RNasin), 5 µl 5x M-MLV Reaktionspuffer, 200 U M-MLV Reverse Transkriptase wurde der Ansatz mit nucleasefreiem Wasser auf 25 µl aufgefüllt und für 10 min bei 21 °C und 50 min bei 50 °C inkubiert. Schließlich wurde der Ansatz für 15 min auf 70 °C erhitzt und bis zu weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Als Kontrolle für Kontamination der RNA durch genomische DNA wurde von jeder Probe ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase erstellt.

2.2.4.2. Quantitative Realtime PCR (qPCR)

Zur quantitativen Analyse der Expression verschiedener Gene, wurde eine Realtime PCR durchgeführt. Dabei wurde ein auf dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I basierendes Messverfahren verwendet. Gebunden an doppelsträngige DNA, ist die Fluoreszenzintensität von SYBR Green um etwa das Tausendfache stärker, im

Vergleich zum ungebunden Zustand. Die Emissionsintensität ist proportional zur DNA-Konzentration in der Probe.

Die für die qPCR verwendeten Primersequenzen (s. Kapitel 2.1.4.) wurden selbst erstellt, waren intronspanning oder -flanking und wurden von der Firma Life Technologies (Invitrogen) synthetisiert. Alle Primer wurden in ddH₂O (PCR-Grade) resuspendiert. Sense- und Antisense-Primer wurden vor dem Ansetzen der PCR Reaktion im Verhältnis 1:1 gemischt. Für die qPCR Reaktionen wurde der LightCycler® 480 SYBR Green I Mastermix, welcher bereits dNTPs, SYBR Green und eine FastStart Taq DNA Polymerase enthält, verwendet. Es wurden jeweils 10 µl Ansätze vorbereitet, welche, neben dem Mastermix, 1 µl der cDNA und jeweils 10 pM des sense bzw. antisense Primer enthielten. Die verwendeten PCR-Konditionen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Zur Evaluierung der Spezifität der Primer wurde eine Schmelzkurvenanalyse und Agarose-Gel-Elektrophorese des PCR-Produktes durchgeführt.

Tabelle 1: Realtime PCR-Konditionen

Schritt	Temperatur	Dauer	
Enzymaktivierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	95°C	15 sec	} 40 Zyklen
Primerhybridisierung	57-62°C	10 sec	
Extension	72°C	10 sec	
Auslesen der Fluoreszenzintensität			

Die Messungen und die Datenanalyse wurden mit dem LightCycler® 480 System (Roche) durchgeführt. Zur Analyse der Daten wird der sog. Threshold-Cycle (C_T) benötigt. Der C_T bezeichnet die Zyklenzahl, bei welcher ein definierter Fluoreszenzwert gemessen wurde. Der Schwellwert zur Bestimmung der C_T -Werte wurde von der LightCycler® Software automatisch berechnet. C_T und die ursprüngliche Konzentration der spezifischen cDNA sind invers proportional zu einander, je weniger cDNA ursprünglich vorhanden war, desto höher ist der C_T -Wert. Die Expression des Zielgens wurde auf die Expression des Referenzgens β -Aktin, unter Berücksichtigung der PCR-

Effizienz, normalisiert (Pfaffl 2001). Die Effizienz wurde aus den C_T -Werten einer Verdünnungsreihe des Standards berechnet, für den Standard wiederum wurde ein Gemisch aus allen cDNAs, welche bei der PCR verwendet wurden, eingesetzt. Der verdünnte Standard wurde immer mit den zu analysierenden Proben gleichzeitig gemessen.

2.2.5. Aldosteron-ELISA

Zur Bestimmung des Aldosteronsekretion der NCI-H295R Zellen wurde ein spezifischer ELISA auf Aldosteron (IBL, Deutschland) im Zellkulturmedium von transfizierten Zellen durchgeführt. Dafür wurden zunächst NCI-H295R Zellen mit pIRES-CD8-Plasmiden mit rAtp1a1 WT und den Mutanten (L104R, V332G und G99R) elektroporiert und für 48h kultiviert. Das Medium wurde abgenommen, für 10 min bei 11.000 g zentrifugiert und der Überstand wurde bis zur Weiterverwendung bei -80 C° aufbewahrt. Die Zellen wurden mit RIPA-Lysepuffer aufgeschlossen (s. Kapitel 2.2.2.) und die Proteinkonzentration wurde mittels Bradfordassay bestimmt. Die durch den ELISA ermittelte Aldosteronkonzentration wurde auf das Gesamtprotein jeder einzelnen Probe normalisiert. Die Bestimmung des Aldosterons im Zellkulturmedium wurde nach Herstellerprotokoll von Dr. Philipp Tauber durchgeführt.

2.2.6. Flammenphotometrie

Zur Bestimmung der intrazellulären Na^+ und K^+ Konzentration in NCI-H295R Zellen wurden Ganzzelllysate hergestellt, welche mit Hilfe des Flammenphotometers PFP7 von Jenway (Stone, Großbritannien) analysiert wurden. Das Prinzip der Flammenphotometrie beruht darauf, dass Atome bei thermischer Anregung (z. B. durch eine Flamme) Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Die flüssige Probe wird zunächst mittels Pressluft zerstäubt und das entstandene Aerosol in die Brennkammer geleitet. Das emittierte Licht der dort durch die Flamme angeregten Elemente, gibt der Flamme eine Element-spezifische Färbung, deren Intensität proportional zur Ionenkonzentration in der Probe ist.

Zunächst wurden die transfizierten Zellen mit einer 300 mM Mannitollösung gewaschen, um alle extrazellulär vorhandenen Elektrolyte zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 300 μ l ddH₂O pro $2 \cdot 10^6$ Zellen auf Eis für 2 h osmolytisch aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde in ein 1,5 ml Eppendorfcup überführt

und mit einer 28G Kanüle homogenisiert. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 11.000 g (4 °C) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfcup überführt, von diesem Überstand wurde ein Aliquot entnommen, mit Proteinase-Inhibitor versetzt und mittels Bradford-Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) der Gesamtproteingehalt der Probe bestimmt. Der Rest der Probe wurde bei -20 °C bis zur Vermessung aufbewahrt. Die Zelllysate wurden direkt vor der Messung in einem Verhältnis von 1:20 bis 1:40 in ddH₂O verdünnt. Vor der Bestimmung der Ionenkonzentrationen wurde das Photometer mit einer Kalibrierkurve geeicht (jeweils für Na⁺ und K⁺). Die mit dem Flammenphotometer gewonnenen Werte für Na⁺ und K⁺ wurden auf die Proteinkonzentration des Zelllysats normalisiert.

2.2.7. Patch-Clamp Experimente

Die Experimente wurden bei Raumtemperatur unter konstanter Perfusion (2 ml/min) durchgeführt. Die Pipettenlösung wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert und direkt am Messtag aufgetaut. Die Deckgläschen mit den transfizierten Zellen wurden mit Silikonfett an der Perfusionskammer fixiert, welche in ein inverses Mikroskop platziert wurde. Für die Patch-Pipetten wurden Kapillaren aus Borosilikat (mit Filament) verwendet, die mit dem Zeitz DMZ Universal Puller (Zeitz, Martinsried, Deutschland) gezogen und feuerpoliert wurden.

Die Pulse zur Stimulation der Zellen wurden mit der Software PatchMaster v2x50 und einem EPC 10 Verstärker (HEKA Electronic, Lamprecht, Deutschland) generiert, die Daten wurden mit dem PowerLab Data Acquisition System mit der dazugehörigen Software LabChartPro v7 erfasst. Das Stimulationsprotokoll bestand aus einer Spannungstreppe, bei welcher das Membranpotenzial auf einer bestimmten Spannung gehalten (Voltage-Clamp-Modus) und die entstandenen Ganzzellströme bestimmt wurden. Die Spannungstreppe reichte von -120 mV bis +30 mV in Schritten von 30 mV, welche jeweils 10 ms lang gehalten wurden. Zur Bestimmung des Membranpotenzials der Zelle wurde nach jeder Spannungstreppe der Stromfluss der Zelle für 20 s auf null Ampere geklemmt (Current-Clamp-Zero-Modus). Der Stimulationsblock aus Strom- und Spannungsklemme wurde über die gesamte Dauer des Experimentes wiederholt.

2.2.7.1. Ganzzellmessungen

Für die durchgeführten Ganzzellmessungen wurden Patch-Pipetten mit einem Widerstand von 7-10 MOhm verwendet. Zum Erreichen dieser Konfiguration wurde die Patch-Pipette an die Zelle herangeführt und unter leichtem Unterdruck die Zellmembran angesaugt, bis ein Widerstand im Gigaohm Bereich entstand (Gigaseal). Anschließend wurde ein höherer Unterdruck auf den Membranfleck ausgeübt bis die Zellmembran durchbrochen wurde, um so den elektrischen Zugang zur ganzen Zelle zu ermöglichen. Nach Erreichen der Ganzzellkonfiguration wurden kapazitative Artefakte kompensiert.

2.2.7.2. Messungen in der „perforated-patch“-Konfiguration

Für die "perforated patch"-Experimente wurde am Messtag 100 µg/ml Nystatin (Sigma) zur Pipettenlösung gegeben und auf Eis im Dunkeln gelagert. Da Nystatin schnell degradiert, wurde alle 2 h eine frische Pipettenlösung angesetzt. Die verwendeten Patch-Pipetten hatten einen Widerstand von 5-7 MOhm. Vor Eintauchen in die Badlösung wurde ein leichter Überdruck auf die Pipette gelegt, um ein Auswaschen des Nystatins aus der Pipettenspitze zu verhindern. Der Überdruck wurde kurz vor der Berührung der Zellmembran wieder gelöst. Anders als bei der Ganzzellkonfiguration wurde bei der „perforated-patch“-Konfiguration die Zellmembran nach Erreichen eines Gigaseals nicht eingerissen, sondern gewartet, bis das Nystatin in der Pipettenlösung die Zellmembran perforiert hatte. Diese Konfiguration ermöglicht durch die Porenbildung elektrischen Zugang zur Zelle, während die Barrierefunktion des Membranflecks größtenteils intakt bleibt, d. h. es werden keine zytosolischen Proteine durch die Pipettenlösung ausgewaschen und die intrazelluläre Ionenhomöostase bleibt länger erhalten.

2.2.8. Live cell imaging

2.2.8.1. Intrazelluläre Ca²⁺-Messungen

Die Bestimmung des freien intrazellulären Ca²⁺ in Einzelzellen wurde mit Hilfe des ratiometrischen Fluoreszenz-Indikators Fura-2 durchgeführt. Transfizierte NCI-H295R Zellen wurden zunächst für 3 min mit einer Ringerlösung mit anti-CD8-Dynabeads markiert und anschließend bei Raumtemperatur für 40 min im Dunklen in Ringerlösung, welche 2 µM des membranpermeablen Fura-2-Acetoxymethylesters und

1X Powerload enthielt, beladen. Die AM-Gruppen werden durch intrazelluläre Esterasen abgespalten und es entsteht das hydrophile Fura-2, welches nicht mehr membrangängig ist und sich so in der Zelle anreichern kann. Nach dem Beladen wurde die Fura-2-Lösung entfernt und die Zellen mit Ringerlösung gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen in eine Messkammer eingespannt und in das Mikroskop platziert. Während des gesamten Experimentes wurde die Messkammer mit einer 37 °C warmen Badlösung umspült (2 ml/min). Die mit Fura-2 beladenen Zellen wurden alle 5 sec abwechselnd mit 340 nm (für 160 ms) und 380 nm (für 90 ms) über ein Lambda DG-4 System belichtet. Die Emission wurde bei 510 nm aufgezeichnet. Bei steigender Ca^{2+} -Konzentration steigt die Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und nimmt ab bei der Anregung mit 380 nm, bei abfallender Ca^{2+} -Konzentration verhält es sich genau umgekehrt. Die Ratio aus den Emissionsintensitäten bei 340 nm und 380 nm diente als Maß für das intrazelluläre Ca^{2+} -Level. Bestimmt wurde die Ratio von Einzelzellen, aus diesen Ratios wurde der dargestellte Mittelwert berechnet. Für die Messungen wurde ein aufrechtes Mikroskop (Zeiss Examiner A1) mit einem 40x Objektiv verwendet, welches an eine AxioCam Mrm Kamera (Zeiss) gekoppelt ist. Zur Aufnahme und Analyse der Daten wurde die Axiovision Software von Zeiss verwendet.

2.2.8.2. Intrazelluläre pH-Messungen

Der intrazelluläre pH wurde mit dem ratiometrischen pH-Indikator BCECF bestimmt. NCI-H295R Zellen (ausgesät auf Glasplättchen) wurden bei 37 °C für 20 min in Ringerlösung mit 1 μM des membranpermeablen Acetoxymethylester-Derivats von BCECF (BCECF-AM) beladen. Transfizierte NCI-H295R Zellen wurden zuvor für 3 min mit einer Ringerlösung mit anti-CD8-Dynabeads markiert. Die Messungen fanden bei 37 °C und konstanter Perfusion (2 ml/min) statt. Der BCECF-Farbstoff wurde alle 10 sec mit 495 nm (für 12 ms) und 440 nm (für 120 ms) angeregt und jeweils die Emission bei 535 nm gemessen. Die Fluoreszenzintensität von BCECF steigt bei Anregung mit 495 nm bei steigendem pH-Wert, die Emissionsintensität bei Anregung mit 440 nm hingegen zeigt kaum Veränderungen bei Änderungen des pH-Wertes. Als Maß für das intrazelluläre pH Level diente die Ratio der Emissionen von 495 nm und 440 nm, die Ratio wurde einzeln für jede Zelle im Sichtfeld bestimmt. Zur Aufnahme und Analyse der Experimente wurde die MetaFluor-Software (Molecular Devices) verwendet.

2.2.9. Statistik

Die Daten zeigen den Mittelwert (MW) der Einzelmessungen \pm den Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Die angegebene Anzahl „n“ bezeichnet entweder die Anzahl der einzelnen gemessenen Zellen (Patch-Clamp, Ca^{2+} -Messungen, pH-Messungen) oder die Anzahl an vermessenen Kulturschälchen (Real-Time PCR, Aldosteron-Elisa, Flammenphotometrie). Zur statistischen Auswertung wurde der ungepaarte Student's T-Test verwendet. Unterschiede zwischen den Gruppen mit einem p-Wert $< 0,05$ wurden als signifikant angesehen und mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

KAPITEL 3

ERGEBNISSE

3.1. Expression der Na⁺/K⁺-ATPase in NCI-H295R Zellen

Zunächst wurde überprüft, ob die mutierte cDNA der Na⁺/K⁺-ATPase aus der Ratte in der human Zelllinie NCI-H295R exprimiert wurde. Dazu wurden, 48 h nach Transfektion, Zelllysate mittels Western Blot auf die Expression der Ratten-Na⁺/K⁺-ATPase hin analysiert. Zum Nachweis der Überexpression auf Proteinebene wurde ein speziell für unser Labor angefertigter Antikörper verwendet, da kommerziell kein Antikörper zur Verfügung stand, welcher ausschließlich die Na⁺/K⁺-ATPase der Ratte erkennt und nicht zusätzlich das humane Protein. Der in Abb. 7 dargestellte Western Blot zeigte eine positive Bande auf der erwarteten Höhe von ca. 100 kDa für die Probe aus der Rattenniere (+) und war negativ für NCI-H295R Zellen, welche nur mit leerem Vektor transfiziert wurden (CD8), also ausschließlich die humane Na⁺/K⁺-ATPase exprimierten. Dies zeigt, dass der Antikörper zuverlässig und spezifisch nur die Na⁺/K⁺-ATPase der Ratte erkennt. In allen Proben, welche entweder mit der Wildtyp (WT) oder mutierten (L104R, V332G, G99R) rAtp1a1 cDNA transfiziert wurden, konnte die Expression des Proteins nachgewiesen werden. Als Beladungskontrolle diente β -Aktin (42 kDa), beide Färbungen wurden auf demselben Blot durchgeführt.

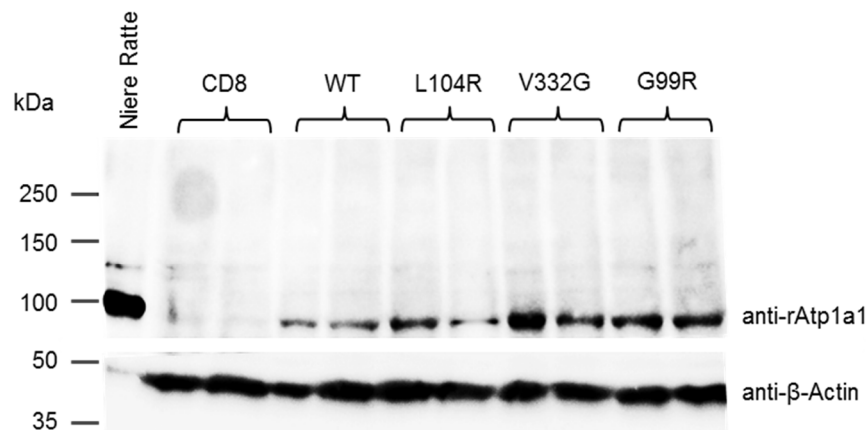


Abbildung 7: Western Blot zum Nachweis der Na^+/K^+ -ATPase der Ratte in transfizierten NCI-H295R Zellen. Es wurden jeweils 200 μg Protein des NCI-H295R Zelllysates transfizierter Zellen aufgetragen und 30 μg der Positivkontrolle (Protein der Rattenniere). Sowohl das murine WT Protein, als auch die mutierten Proteine wurden exprimiert. Als Beladungskontrolle diente die Expressionsstärke von β -Actin. CD8 kennzeichnet Zellen, die mit dem leeren Vektor transfiziert waren.

Zusätzlich wurde überprüft, ob die Mutanten ebenfalls in der Plasmamembran lokalisiert sind, da es auf Grund der Mutation möglich sein könnte, dass der Transport zur Plasmamembran beeinflusst wird. Dazu wurden die Zellen 48h nach Transfektion mit der rAtp1a1 cDNA (WT oder Mutanten) und mit einem Antikörper gegen die α -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase gefärbt (Abb. 8). Da der im Western Blot verwendete Antikörper in humanen Zellen nicht nur die Ratten- Na^+/K^+ -ATPase detektierte, sondern auch unspezifische Bindestellen aufwies, wurde für die Färbungen der kommerzielle Antikörper gegen die humane und Ratten- α 1-Untereinheit verwendet. Transfizierte Zellen wurden mit anti-CD8-Dynabeads markiert, um sie von nicht-transfizierten Zellen optisch unterscheiden zu können. Die Beads zeigen ebenfalls eine grüne Fluoreszenz, da der CD8-Antikörper aus dem gleichen Wirt (Maus) wie der Na^+/K^+ -ATPase Antikörper stammte. Die Färbungen der untransfizierten Zellen zeigen die Expression der endogenen α 1-Untereinheit. Die Immunfluoreszenz der transfizierten Zellen deutet darauf hin, dass sowohl WT als auch die Mutationen L104R, V332G und G99R in der Zellmembran lokalisiert sind, obwohl ein Teil des Proteins auch im Zytosol lokalisiert ist. Des Weiteren lassen die Färbungen auf eine relativ geringe Transfektionseffizienz schließen.

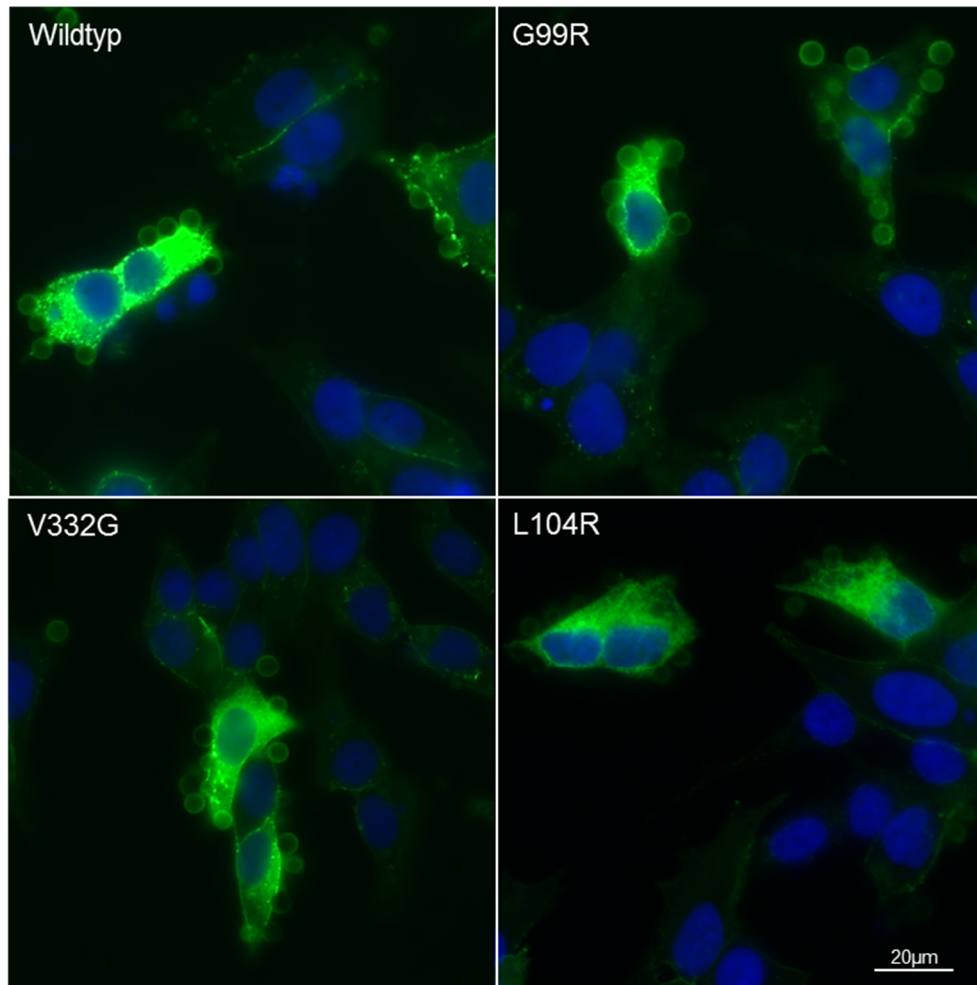


Abbildung 8: Immufluoreszenzfärbung transfizierter NCI-H295R Zellen.

Zellen wurden mit der rAtp1a1 cDNA (WT und Mutanten) transfiziert und mit einem Antikörper gegen die Na^+/K^+ -ATPase markiert. Grün: α -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase; Blau: Zellkerne (Hoechst-Farbstoff). Zur Detektion transfizierter Zellen wurden Zellen mit anti-CD8-Dynabeads markiert (zu sehen als grüne Kugeln an den Zellen). Die markierten Zellen zeigen eine deutlich stärkere Fluoreszenz als nicht markierte Zellen (Expressionslevel der endogene Na^+/K^+ -ATPase). Sowohl WT als auch die Mutanten L104R, V332G und G99R scheinen in der Zellmembran lokalisiert zu sein, dennoch scheint auch Protein im Zytosol lokalisiert zu sein.

3.2. Analyse des Steroidhormonsynthesewegs in Zellen mit mutierter Na^+/K^+ -ATPase

APAs führen zu einer Stimulus-unabhängigen, autonomen Aldosteronproduktion. Die über Exom-Sequenzierung gefundenen Mutationen im ATP1A1-Gen scheinen ursächlich für diese unkontrollierte Aldosteronfreisetzung zu sein. Daher wurde

zunächst der Einfluss der Mutationen auf die Steroidhormonsynthese in den adrenokortikalen NCI-H295R Zellen untersucht.

3.2.1. Expression steroidogener Enzyme

Die Expression verschiedener Gene des Aldosteron-Synthesewegs (STAR, CYP11A1, CYP17A1, HSD3B2, CYP21A2, CYP11B1, CYP11B2) wurde mittels qPCR 48 h nach Transfektion der NCI-H295R Zellen quantifiziert. Der Wildtyp alleine führte zu keiner signifikanten Veränderung der Genexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen (CD8-transfizierte Zellen). Alle Mutationen führten zu einer Erhöhung der Genexpression der Enzyme HSD3B2 (x-fache Erhöhung: L104R: $1,3 \pm 0,07$, V332G: $1,31 \pm 0,07$, G99R: $1,15 \pm 0,05$) und der Aldosteronsynthese (CYP11B2; x-fache Erhöhung: L104R: $2,01 \pm 0,17$, V332G: $1,78 \pm 0,13$, G99R: $1,48 \pm 0,17$). Andere Enzyme waren nicht durch alle Mutationen signifikant verändert. Auffällig ist allerdings, dass die Mutation L104R die Expression aller analysierten Enzyme (außer der CYP11B1) ansteigen ließ. Es ist aber zu berücksichtigen, dass auf Grund der geringen Transfektionseffizienz die untransfizierten Zellen mögliche Effekte in den transfizierten Zellen abschwächen könnten.

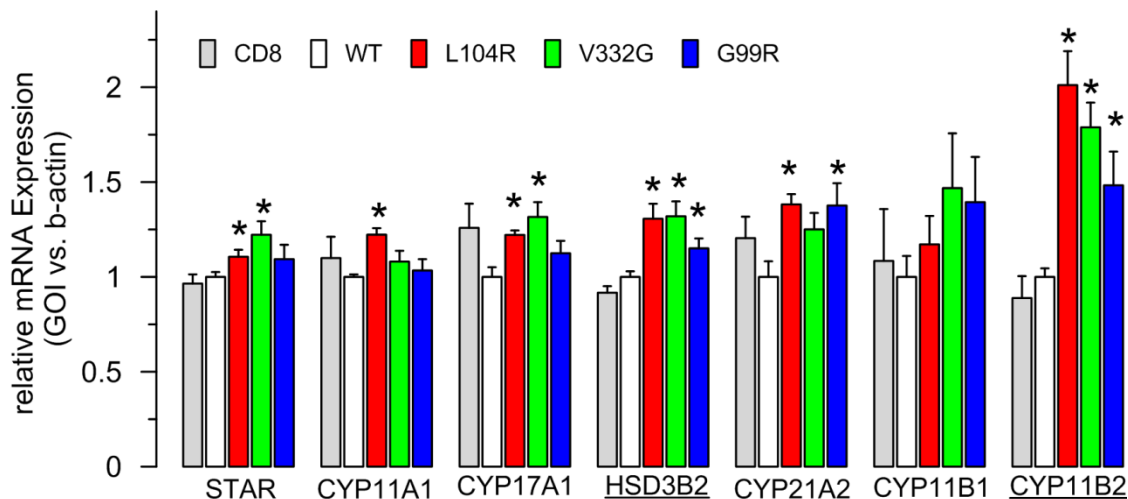


Abbildung 9: mRNA Expression verschiedener Enzyme des Steroidhormonsynthesewegs in transfizierten NCI-H295R Zellen. Die mRNA Expression wurde mittels Realtime PCR analysiert und auf die β -Aktin Expression normalisiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM der mRNA Expression der einzelnen Gene (GOI = Gene of interest) von 5-7 Proben aus zwei Versuchsreihen. Die Expression wurde auf die der rAtp1a1 WT exprimierenden Zellen normalisiert, die Signifikanzen beziehen sich ebenfalls auf das Expressionslevel der WT-transfizierten Zellen.

3.2.2. ATP1A1-Mutationen steigerten die Aldosteronsynthese

Auf Grund der gesteigerten Expression der Aldosteronsynthase in Zellen mit mutierter Na^+/K^+ -ATPase wurde nachgeprüft, ob dies letztendlich auch in einer erhöhten Aldosteronsekretion resultiert. Daher wurde die Aldosteronkonzentration im Zellkulturmedium von NCI-H295R Zellen, welche die WT Na^+/K^+ -ATPase oder eine der Mutanten L104R, V332G und G99R exprimierten, mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Im Vergleich zum WT führten die Mutanten der Na^+/K^+ -ATPase zu einer Erhöhung der Aldosteronsekretion. Der stärkste Effekt wurde durch die Mutation L104R hervorgerufen.

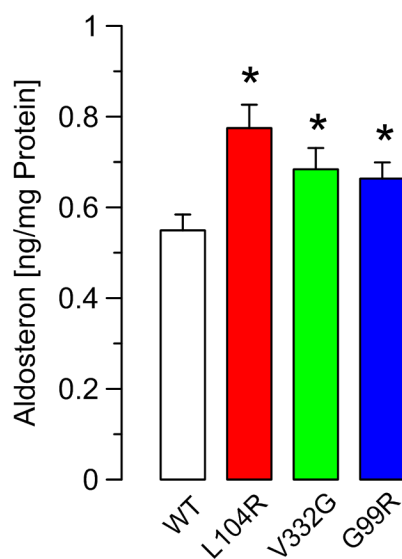


Abbildung 10: Aldosteronkonzentration im Zellkulturmedium transfizierter NCI-H295R Zellen.

Aldosteronkonzentration wurde 48 h nach Transfektion mittels ELISA analysiert. Die Konzentrationen wurden jeweils auf die Zellproteinmenge normalisiert. Die Expression der mutierten rAtp1a1 cDNA führte zu einem Anstieg der Aldosteronsekretion im Vergleich zu WT-Zellen. Daten zeigen MW \pm SEM (n = 6).

3.3. Einfluss der Mutationen auf das Membranpotenzial und den Elektrolythaushalt

Die Na^+/K^+ -ATPase transportiert für jedes hydrolysierte ATP 3 Na^+ -Ionen aus der Zelle und ein 2 K^+ -Ionen in die Zelle, damit ist sie einer der wichtigsten Mechanismen zur Aufrechterhaltung des transmembrären Na^+ - und K^+ -Gradienten. Es liegt die Vermutung nahe, dass Mutationen, die zu einem Verlust der Pumpaktivität dieses Proteins führen, einen erheblichen Einfluss auf die intrazelluläre Ionenhomöostase und dadurch auch auf das Ruhemembranpotenzial haben könnten.

3.3.1. Mutationen verursachten eine Membrandepolarisation

Unser Labor konnte in Vorarbeiten bereits nachweisen, dass eine Überexpression der Mutante L104R zu einer starken Depolarisation führte. Weiterführend wurde im Zuge dieser Studie der Effekt der Mutationen V332G und G99R auf das Membranpotenzial von HEK-293 Zellen daraufhin ebenfalls untersucht.

Dazu wurden HEK-293 Zellen mit der WT Na^+/K^+ -ATPase oder den Mutanten V332G und G99R elektroporiert und 48 h nach Transfektion mittels Patch-Clamp Messungen in Ganzzellkonfiguration analysiert. HEK-293 Zellen, welche die Na^+/K^+ -ATPase mit den Mutationen V332G bzw. G99R überexprimierten, zeigten eine Membrandepolarisation im Vergleich zu Zellen mit WT Na^+/K^+ -ATPase. Der Austausch von Na^+ durch NMDG⁺ in der extrazellulären Badlösung führte sowohl in WT als auch in G99R exprimierenden Zellen zu einer geringen Hyperpolarisation, sie betrug ca. -9 mV. In Zellen, welche die V332G Mutation trugen, bewirkte die Entfernung von Na^+ dagegen eine starke Hyperpolarisation, das Membranpotenzial fiel um ca. -26 mV auf das der WT Zellen.

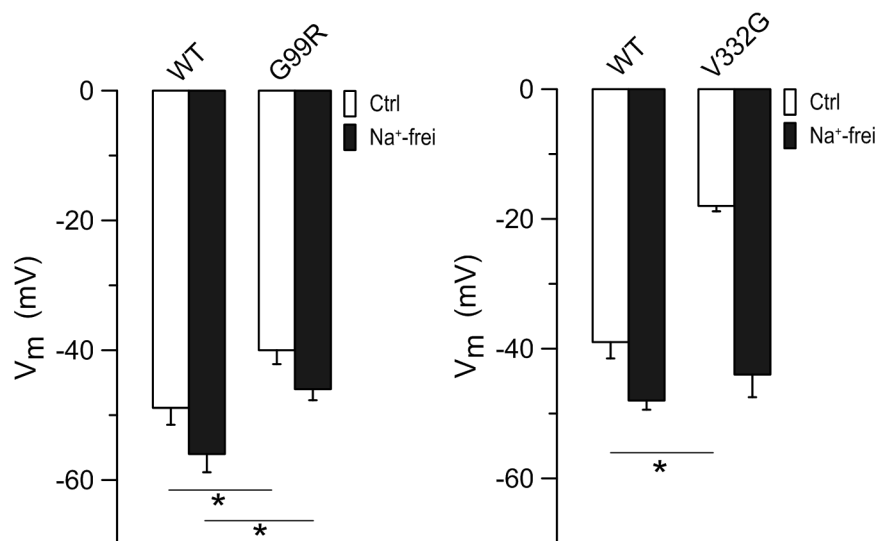


Abbildung 11: Membranpotenzial transfizierter HEK-293 Zellen.

Ganzzellmessungen von HEK-293 Zellen transfiziert mit **A)** rAtp1a1 WT und G99R und **B)** rAtp1a1 WT und V332G. Gezeigt wird jeweils der Mittelwert \pm SEM des Membranpotenzials unter Kontrollbedingungen (weiß) und unter Wegnahme des extrazellulären Na^+ (schwarz). Beide Mutationen führten zur Depolarisation der Zellmembran im Vergleich zu WT-Zellen. Die Wegnahme von Na^+ führte im WT und der G99R zu einer leichten Hyperpolarisation, der Unterschied zw. WT und G99R im V_m blieb dennoch erhalten. Zellen mit der V332G Mutation hyperpolarisierten fast auf das V_m der WT-Zellen.

3.3.2. Veränderte intrazelluläre Na⁺- und K⁺-Homöostase

Um den Einfluss der Mutationen auf Nebennierenzellen genauer untersuchen zu können, wurden die weiteren Experimente in der aus einem Nebennierenkarzinom stammenden Zelllinie NCI-H295R durchgeführt. Mittels Flammenphotometrie wurde zunächst getestet, ob die intrazellulären Konzentrationen von Na⁺ und K⁺ in transfizierten NCI-H295R Zellen verändert waren.

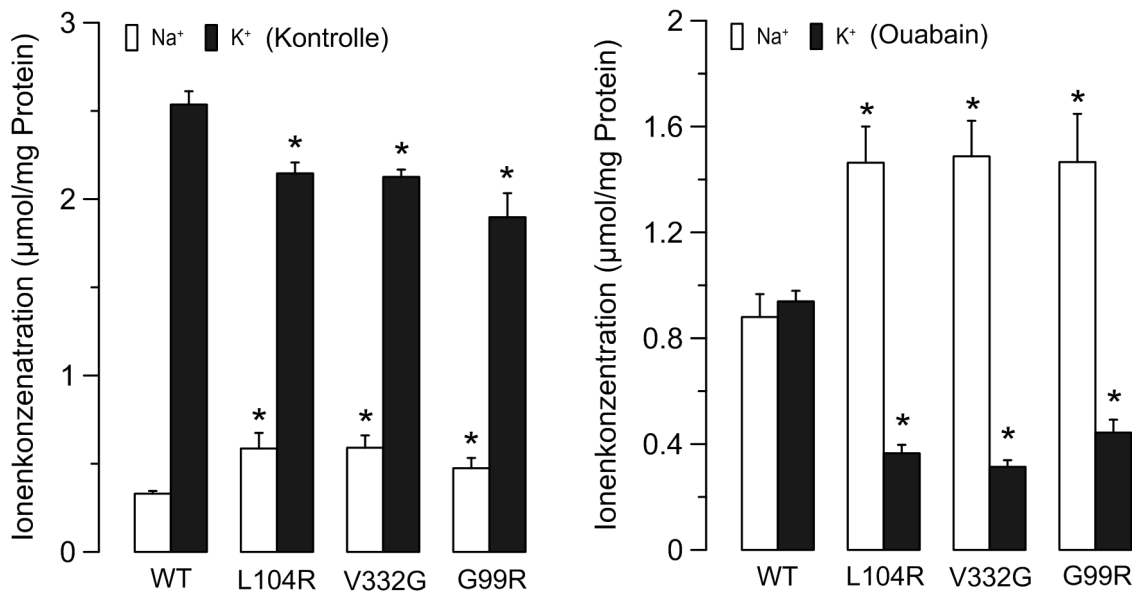


Abbildung 12: Intrazelluläre Na⁺- und K⁺- Konzentrationen in NCI-H295R Zellen mit rAtp1a1 WT oder Mutanten. Die Na⁺- (weiß) und K⁺- (schwarz) Konzentrationen in den NCI-H295R Zelllysaten wurden mittels Flammenphotometer bestimmt. Im Vergleich führte die Expression der Mutanten unter Kontrollbedingungen zum Anstieg der Na⁺- und Abfall der K⁺-Konzentration in NCI-H295R Zellen (links). Bei Hemmung der endogenen Na⁺/K⁺-ATPase mit Ouabain (rechts) drehte sich das Verhältnis von Na⁺ zu K⁺ in den die Mutanten exprimierenden Zellen um, in WT-Zellen glichen sich die Konzentrationen hingegen an. Signifikanzen beziehen jeweils auf den Mittelwert der WT-transfizierten Zellen (n=6 pro Gruppe).

Abb. 12 zeigt deutlich, dass unter Kontrollbedingungen alle Mutationen zur Reduktion der intrazellulären K⁺-Konzentration und zugleich zu einer Verdoppelung der Na⁺-Konzentration im Vergleich zu den WT exprimierenden Zellen führten. Da in dem verwendeten Zellsystem immer noch endogene Na⁺/K⁺-ATPasen exprimiert werden, welche eine normale Pumpfunktion aufweisen und somit den Pumpverlust der

transfizierten Proteine ausgleichen könnten, wurden weitere Experimente durchgeführt bei welchen die endogenen ATPasen blockiert wurden. Dies ermöglichte eine genauere Analyse der Pumpaktivität der mutierten Proteine. Dazu wurden transfizierte Zellen für 1 h mit dem spezifischen Na^+/K^+ -ATPase Blocker Ouabain ($10 \mu\text{M}$) behandelt. Da die Ratten- Na^+/K^+ -ATPase unempfindlich gegenüber dieser geringen Konzentration des Blockers ist, war es nun möglich zu evaluieren, ob die transfizierten Proteine in der Lage sind, den Ausfall der endogenen ATPase auszugleichen. Wie Abb. 12 (rechts) zeigt, ist unter Ouabain eine Umkehr der intrazellulären Na^+ und K^+ Konzentration in Zellen mit den Mutanten zu beobachten, während in den WT exprimierenden Zellen ein Ausgleich der beiden Ionen zu sehen war.

3.3.3. Effekt von K^+ und Ang II auf das Membranpotenzial adrenal Zellen

Die veränderte intrazelluläre Ionen-Homöostase trägt vermutlich zur Membrandepolarisation bei. Daher wurden die folgenden Patch-Clamp Experimente in der „perforated-patch“-Konfiguration durchgeführt. Im Laufe einer Ganzzellmessung wird das intrazelluläre Milieu durch die Pipettenlösung ausgewaschen und somit würden die veränderten Na^+ - und K^+ -Konzentrationen in den mutierten Zellen verfälscht werden. Bei einer perforierten Zellmembran erhält man elektrischen Zugang zur gesamten Zelle, der Austausch der Ionen verläuft hier jedoch wesentlich langsamer.

Die in HEK-293 Zellen beobachtete Membrandepolarisation konnte ebenfalls in transfizierten NCI-H295R Zellen beobachtet werden ($3,6 \text{ mM}$ extrazelluläres K^+). Interessanterweise reagierten die Zellen mit den Mutanten L104R und V332G unter 15 mM K^+ Kalium nur mit einer geringen Depolarisation im Gegensatz zu WT Zellen und der Mutante G99R, welche wie in der Literatur beschrieben eine starke Depolarisation aufwiesen. Erst bei einer extrazellulären K^+ Konzentration von 50 mM depolarisierten alle Zellen auf ca. -20 mV . Als weiterer Stimulus für die Aktivierung der Aldosteronsekretion, wurde ebenfalls der Effekt von Ang II auf das Membranpotential getestet. Die gemessenen Zellen reagierten auf die Gabe von 20 nM Ang II zunächst mit einer transienten Hyperpolarisation der Zellmembran, gefolgt von einer konstant anhaltenden Depolarisation. Während kein Unterschied in der Hyperpolarisationsphase zu sehen war, fiel die Depolarisation in Zellen mit mutierter Na^+/K^+ -ATPase geringer aus im Vergleich zum WT (ΔV_m in mV : WT: $20,42 \pm 2,0$; L104R: $10,5 \pm 2,7$; V332G: $5,9 \pm 1,7$; G99R: $5,7 \pm 1,9$). Das Delta bezieht sich auf die Differenz zwischen dem Membranpotenzial in der Depolarisationsphase (c) und dem Ruhemenbranpotenzial (a).

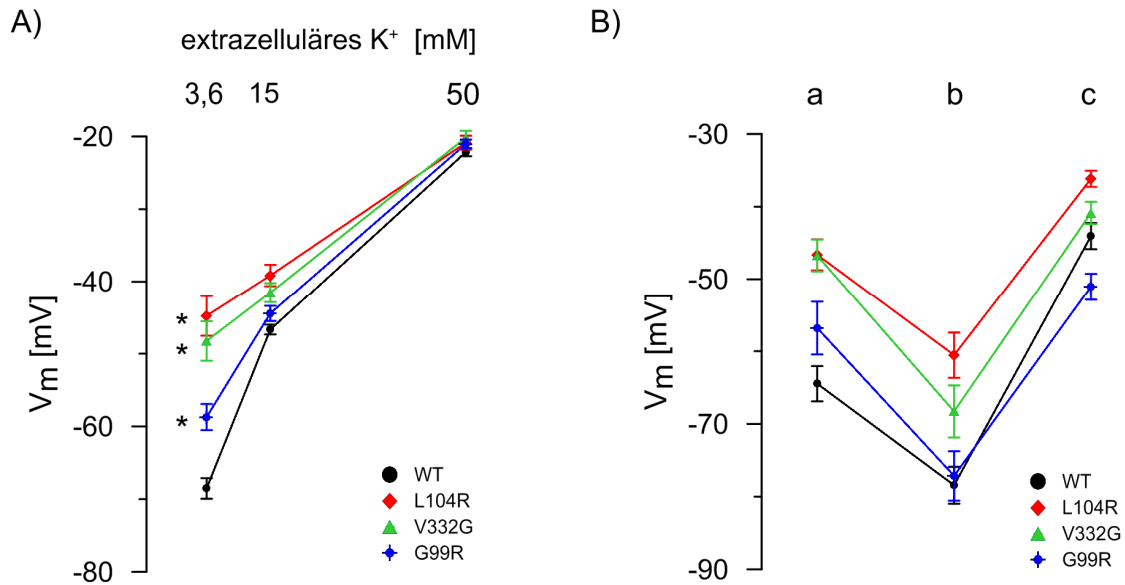


Abbildung 13: Veränderung des Membranpotenzials durch Stimulation mit K^+ (A) und Ang II (B). Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM des Membranpotenzials (perforated-patch) von NCI-H295R Zellen. **A)** Unter Kontrollbedingungen (3,6 mM K^+) waren die mutierten Zellen im Vergleich zu WT Zellen depolarisiert. Unter 15 mM K^+ wird dieser Unterschied geringer und bei 50 mM K^+ ist er nicht mehr vorhanden ($n = 8-17$). **B)** Membranpotenzial vor (a) und während Stimulation mit 20 nM Ang II (b und c). Alle Zellen zeigten eine transiente Hyperpolarisation des V_m , gefolgt von einer anhaltenden Depolarisation, welche bei den Mutanten deutlich geringer ausfiel im Vergleich zum WT. Gezeigt sind die Mittelwerte bei maximaler Hyperpolarisation (b) und maximaler Depolarisation (c) in Anwesenheit von Ang II ($n = 4-12$).

3.4. Einfluss der mutierten Na^+/K^+ -ATPasen auf das intrazelluläre Ca^{2+} -Signal nach Stimulation mit K^+ und Ang II

Aus der Literatur ist bekannt, dass in den Glomerulosazellen der Nebenniere eine Membrandepolarisation die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle öffnet, was wiederum den Einstrom von Ca^{2+} in das Zytosol bedingt. Diese Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} ist der Haupttrigger für die Aktivierung der Aldosteronsynthese. Daher wird vermutet, dass eine chronische Depolarisation, hervorgerufen durch die Mutationen in der Na^+/K^+ -ATPase, ähnliche Mechanismen aktiviert und somit die Sekretion von Aldosteron stimuliert. Der Einfluss der Na^+/K^+ -ATPase Mutationen (L104R, V332G, G99R) auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase wurde mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fura-2 bestimmt. Die Experimente wurden mit NCI-H295R Zellen, welche die WT Na^+/K^+ -ATPase oder die Mutanten überexprimierten, durchgeführt.

Wider Erwarten konnte kein offensichtlicher Einfluss der Mutationen auf das basale Ca^{2+} -Level detektiert werden. Allerdings zeigten sich deutliche Veränderungen bei der intrazellulären Ca^{2+} -Antwort nach Stimulation mit 15 mM K^+ bzw. 20 nM Ang II. Normalerweise führt die Stimulation mit 15 mM K^+ in der Badlösung zu einem deutlichen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Levels, wie es in WT und G99R exprimierenden Zellen zu beobachten war. Im Vergleich dazu war der Ca^{2+} -Anstieg unter hoch K^+ in Zellen mit den Mutationen L104R und V332G der Na^+/K^+ -ATPase stark reduziert (Abb. 14).

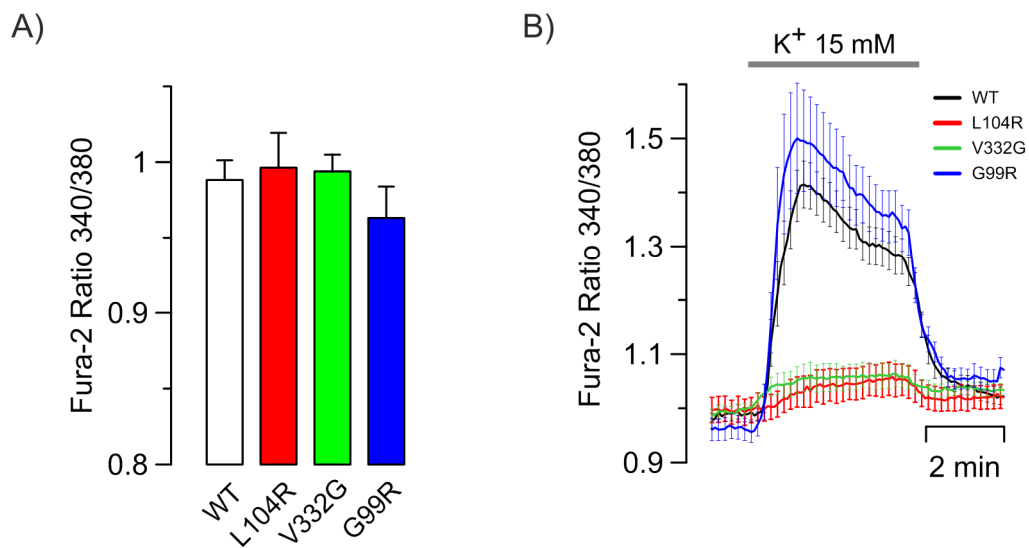


Abbildung 14: Basales Ca^{2+} -Level (A) und intrazelluläres Ca^{2+} -Signaling nach Stimulation mit 15 mM K^+ (B). A) Das basale Ca^{2+} -Level in NCI-H295R Zellen transfiziert mit der mutierten Na^+/K^+ -ATPase war nicht verändert im Vergleich zum WT. B) Stimulation der WT-Zellen und der G99R exprimierenden Zellen mit 15 mM K^+ führte zu einer starken Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Levels, die Zellen mit den Mutanten L104R und V332G zeigten einen stark reduzierten Ca^{2+} -Anstieg. Die Daten zeigen die Mittelwerte der 340 nm/380 nm Fura-2 Ratio (\pm SEM) und sind ein Maß für die zytosolische Ca^{2+} -Aktivität. $n = 10-19$ pro Genotyp in jeweils 4-6 unabhängigen Messungen.

Der Einfluss der Mutationen auf das Ang II-induzierte Ca^{2+} -Signaling wurde ebenfalls evaluiert. Zum Vergleich dieses Effektes wurden untransfizierte Zellen aus dem selben Schälchen wie die verwendeten transfizierten Zellen verwendet, da sich die untransfizierten Zellen in den einzelnen Schälchen untereinander bereits signifikant voneinander unterschieden. Sowohl der WT als auch alle Mutationen wiesen die in Kapitel 1.5.2 beschriebene *peak-plateau* Antwort auf. Im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen aus demselben Schälchen wiesen die mit den Mutanten

transfizierten Zellen sowohl einen deutlich schnelleren Abfall des Peaks auf, als auch ein niedrigeres Ca^{2+} -Level in der Plateau Phase. Die mit dem WT transfizierten Zellen unterschieden sich nicht von den untransfizierten Zellen (Abb. 15). Diese Daten zeigen, dass obwohl keine Veränderung im basalen Ca^{2+} zu erkennen war, die Mutationen dennoch einen deutlichen Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase hatten.

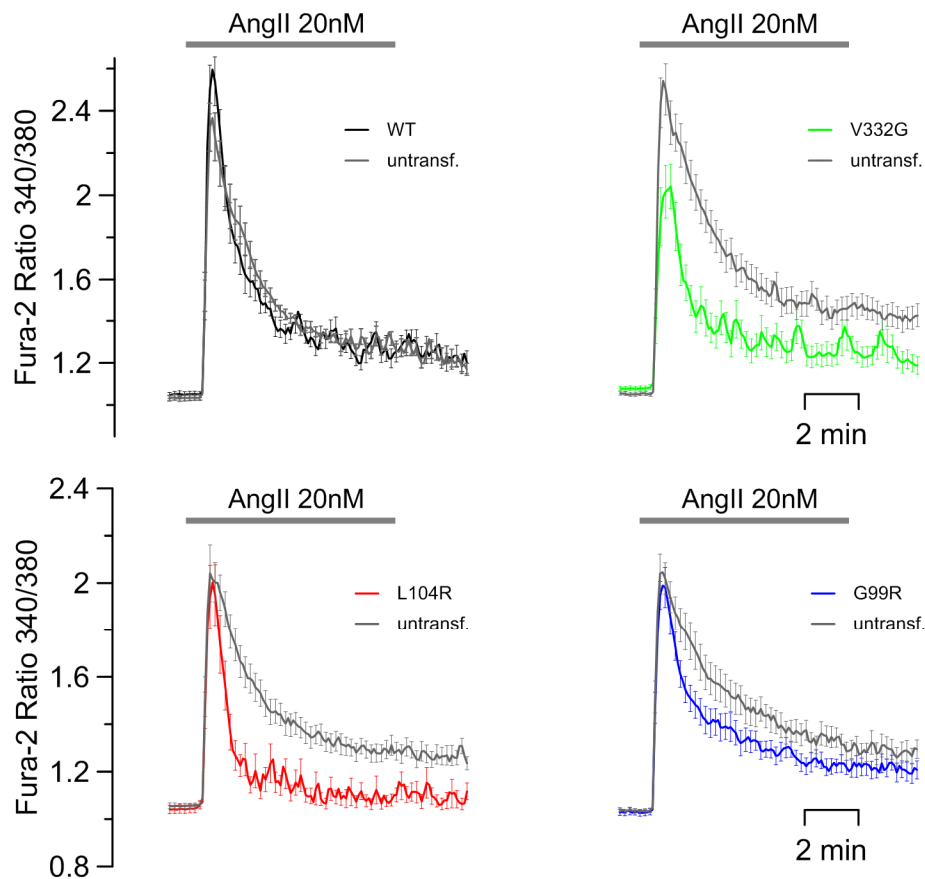


Abbildung 15: Intrazelluläres Ca^{2+} -Signaling nach Stimulation mit AngII. WT-Atp1a1 exprimierende Zellen verhielten sich bei Stimulation mit Ang II genau wie untransfizierte Kontrollzellen (**A**). Im Vergleich zu untransfizierten Zellen zeigten die Zellen mit Atp1a1 Mutanten nach Stimulation mit Ang II einen schnelleren Abfall des Peaks und ein geringeres Ca^{2+} -Level in der Plateauphase (**B-C**). Die Daten zeigen die Mittelwerte der 340 nm/380 nm Fura-2 Ratio (\pm SEM) und sind ein Maß für die zytosolische Ca^{2+} -Aktivität. $n = 13-27$ pro Genotyp in jeweils 4-6 unabhängigen Messungen.

3.5. Na^+/K^+ -ATPase Mutationen führten zu einer gestörten pH-Homöostase

Die bisherigen Daten von Azizan et al. 2013 und Kopec et al. 2014 deuten darauf hin, dass die Mutation L104R eine „*gain-of-function*“ Mutation zu sein scheint, welche zu einem pathologischen H^+ -Einstrom in die Zelle führt. Dies legt den Verdacht nahe, dass die Mutationen einen starken Einfluss auf die intrazelluläre pH-Regulation haben. Der intrazelluläre pH, in L104R und V332G exprimierenden Zellen, war deutlich saurer als der von WT oder G99R exprimierenden Zellen (Abb. 16 A). Des Weiteren wiesen die angesäuerten Zellen nach Perfusion mit Ringerlösung mit einem pH-Wert von pH 7 oder pH 8 eine starke Veränderung des pH_i auf. So fiel deren pH_i unter pH 7 deutlich schneller ab und stieg unter pH 8 deutlich schneller und stärker an (im Vergleich zu WT oder G99R transfizierten Zellen; Abb. 16 B).

Wurden die Zellen mit 15 mM K^+ stimuliert, zeigten sowohl WT als G99R exprimierende Zellen einen Abfall des intrazellulären pH-Wertes. Auffallend war hier die pH-Änderung in den Zellen mit L104R und V332G Mutanten: Sie reagierten mit einer Erhöhung des intrazellulären pH-Werts unter 15 mM K^+ (Abb. 16 C).

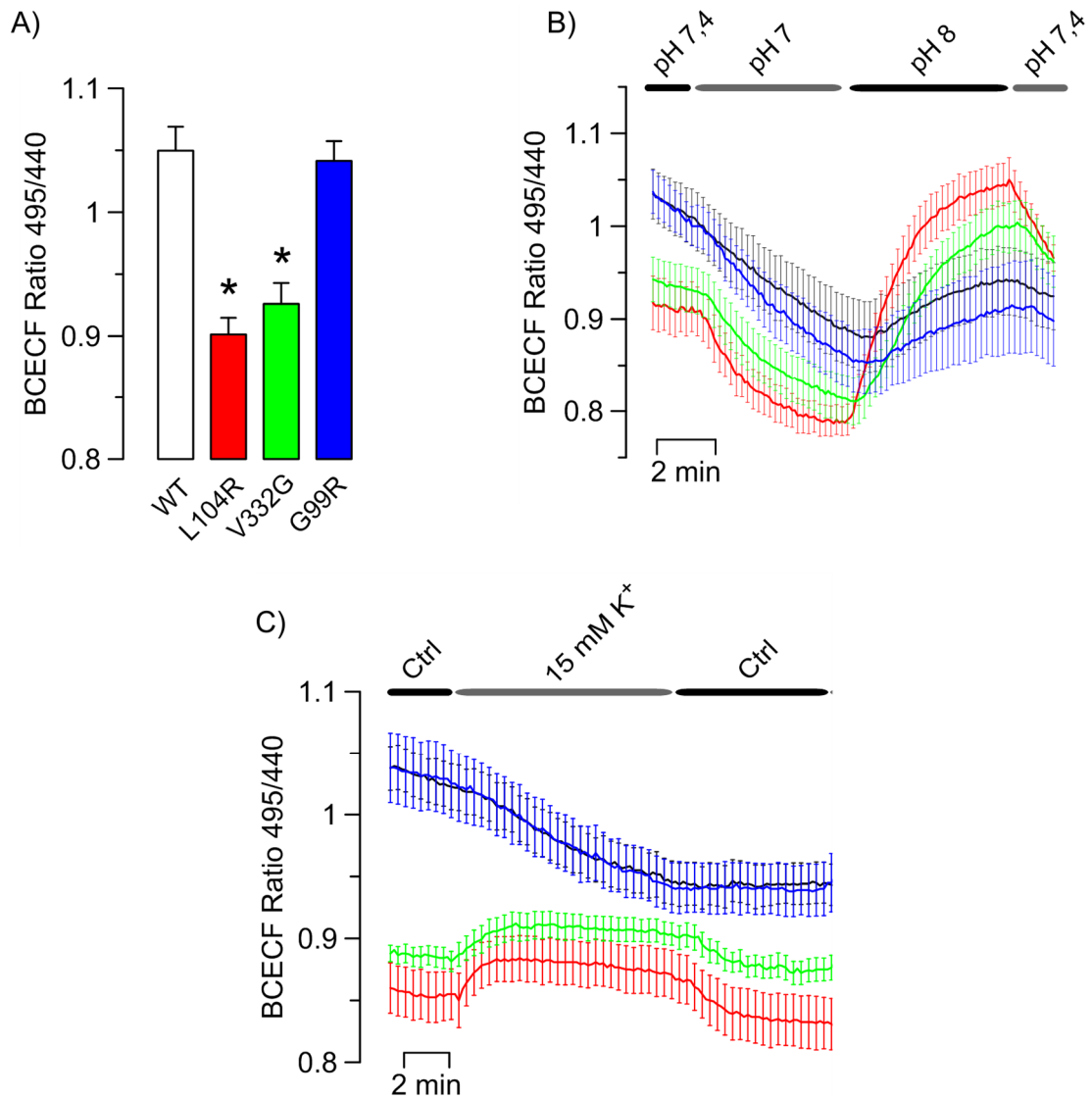


Abbildung 16: Veränderte pH-Homöostase in NCI-H295R Zellen transfiziert mit Wildtyp oder mutierter Na^+/K^+ -ATPase. Die Daten zeigen die Mittelwerte (\pm SEM) der BCECF Ratio bei 495 nm/440 nm Anregung als Maß des intrazellulären pH-Wertes (pH_i). **A)** Zellen, die die Mutanten L104R und V332G exprimierten zeigten einen signifikant reduzierten pH_i im Vergleich zu WT-Zellen. Die Expression der G99R Mutation hatte keinen Einfluss auf den pH_i . **B)** Unter extrazellulärem pH 7 säuerten alle Zellen an, während sie unter pH 8 alkalischer wurden. Die Expression der L104R (rot) und V332G (grün) Mutante führte zu einer stärkeren Veränderung des pH_i als Zellen mit WT (schwarz) oder G99R (blau). **C)** Eine Erhöhung der K^+ -Konzentration auf 15 mM induzierte in WT und G99R exprimierenden Zellen einen Abfall des pH_i , während die Zellen mit L104R und V332G mit einer Erhöhung des pH_i reagierten. (n=10-30 pro Genotyp aus jeweils 4-10 Messungen).

3.6. Erhöhte Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers (NHE)

Es stellte sich nun die Frage, ob diese veränderte Empfindlichkeit gegenüber extrazellulären pH-Änderungen alleine durch einen H^+ -Leckstrom entlang des Gradienten zustande kam oder ob in diesen Zellen andere pH-regulierende Mechanismen verstärkt aktiviert wurden.

Ein essentieller pH-Regulator ist der Natrium-Protonen-Austauscher (NHE). In den Nebennieren sind v. a. NHE1 und NHE2 exprimiert. Um den Beitrag des NHE auf die pathophysiologische Wirkung der ATP1A1-Mutationen auf den pH zu testen, wurde der intrazelluläre pH unter Bedingungen gemessen, welche den NHE-abhängigen H^+ -Efflux inhibieren. Zunächst wurden die in Kapitel 3.5.1. durchgeführten Experimente unter Na^+ -freien Bedingungen wiederholt, da der NHE durch den Austausch des extrazellulären Na^+ durch NMDG⁺ „ausgeschaltet“ werden kann. Unter diesen Bedingungen blieb der in Abb. 16 B gezeigte starke pH-Anstieg durch pH 8 in Zellen mit L104R und V332G Mutation aus (Abb. 17 A). Diese Messungen wurden 24 h nach Transfektion durchgeführt. Interessanterweise verstärkte sich der Effekt nach Wegnahme des extrazellulären Na^+ auf den intrazellulären pH nach 48 h. Unter Na^+ -freien Bedingungen fiel der pH in L104R transfizierten Zellen nach 48 h stark ab, während der pH in WT Zellen unverändert war (Abb. 17 B). Ein ähnlicher Effekt war nach Applikation von 100 μM des NHE1-Blockers Cariporid zu beobachten. Die direkte Inhibition des NHE1 48 h nach Transfektion bewirkte ebenfalls einen Abfall des basalen pH in L104R exprimierenden Zellen, während dies keinen Einfluss auf den basalen pH in WT Zellen hatte. Desweiteren blieb unter diesen Bedingungen die beobachtete abnormale Erhöhung des intrazellulären pHs unter 15 mM K^+ in den rAtp1a1 L104R exprimierenden Zellen aus (Abb. 17 C). Neben der intrazellulären Ansäuerung führte Cariporid auch zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Levels in L104R exprimierenden Zellen (Abb. 17 D).

Es stellte sich nun die Frage, ob die verstärkte Aktivität des NHE1 durch eine gesteigerte Expression des Austauschers zustande kommt. Daher wurde die relative NHE1 mRNA-Expression in mit rAtp1A1 (WT, L104R, V332G, G99R) transfizierten NCI-H295R Zellen gemessen. Die Überexpression der Mutanten bewirkte keine Veränderung der Genexpression des NHE1 (x-fache Erhöhung relativ zum WT: L104R $1,0 \pm 0,04$; V332G $1,0 \pm 0,03$; G99R $1,0 \pm 0,04$).

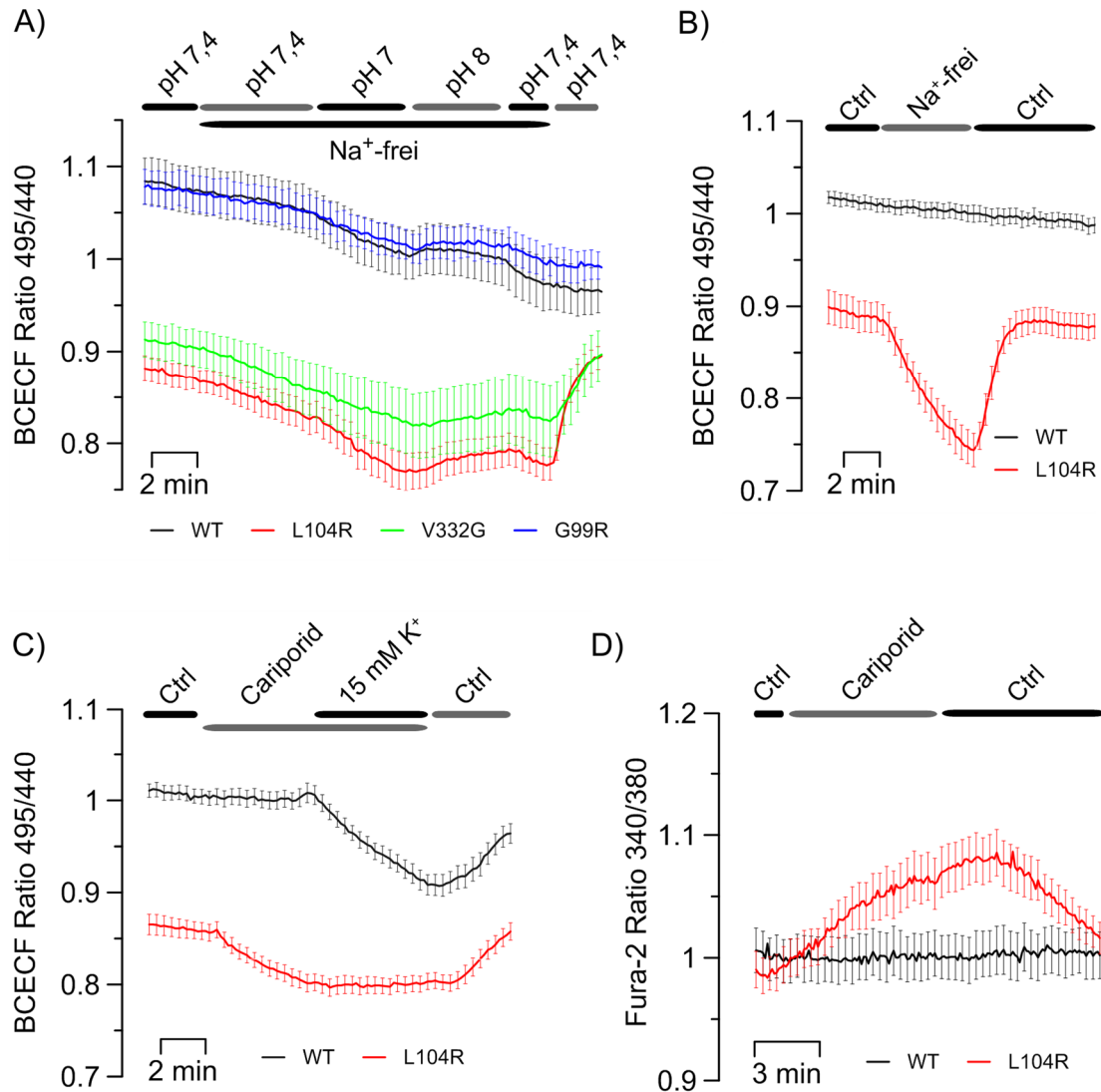


Abbildung 17: Effekt der NHE-Inhibierung auf den intrazelluläre pH (A-C) und das Ca^{2+} -Level (D) in NCI-Zellen transfiziert mit rAtp1a1 WT oder den Mutanten. Die Daten in A-C zeigen die Mittelwerte (\pm SEM) der BCECF Emissionsratio bei 495 nm/440 nm Anregung. **A)** Unter Wegnahme des extrazellulären Na^+ blieb die in Abb. 16 B beobachtete starke pH-Schwankung aus (Messung 24 h nach Transfektion). **B)** Extrazelluläre Na^+ -freie Bedingungen 48 h nach Transfektion führten zu einem starken pH-Abfall in L104R rAtp1a1 exprimierenden Zellen, während der WT keine Veränderungen im pH zeigte. **C)** Der NHE-Blocker Cariporid (100 μM) führte ebenfalls zu einem Abfall des basalen pH_is in Zellen mit L104R Mutation, während der pH_i im WT unverändert blieb. Der Anstieg des pH_i in der L104R-Mutante unter 15 mM K⁺ konnte in Anwesenheit von Cariporid nicht mehr beobachtet werden. In **D)** sind die Mittelwerte der 340 nm/380 nm Fura-2 Ratio (\pm SEM) als Maß für das intrazelluläre Ca^{2+} -Level dargestellt. Die Inhibierung des NHE mit Cariporid führte in Zellen mit Atp1a1 L104R-Mutation zu einem Anstieg des Ca^{2+} , zeigte aber keinen Effekt auf das Ca^{2+} -Level in WT-Zellen. Der Grund für diesen Anstieg ist aber bisher noch unklar (n = 8-21 pro Genotyp, aus jeweils 3-6 Messungen).

3.7. Intrazelluläre Ansäuerung durch die Expression des mutierten Kaliumkanals KCNJ5^{L168R}

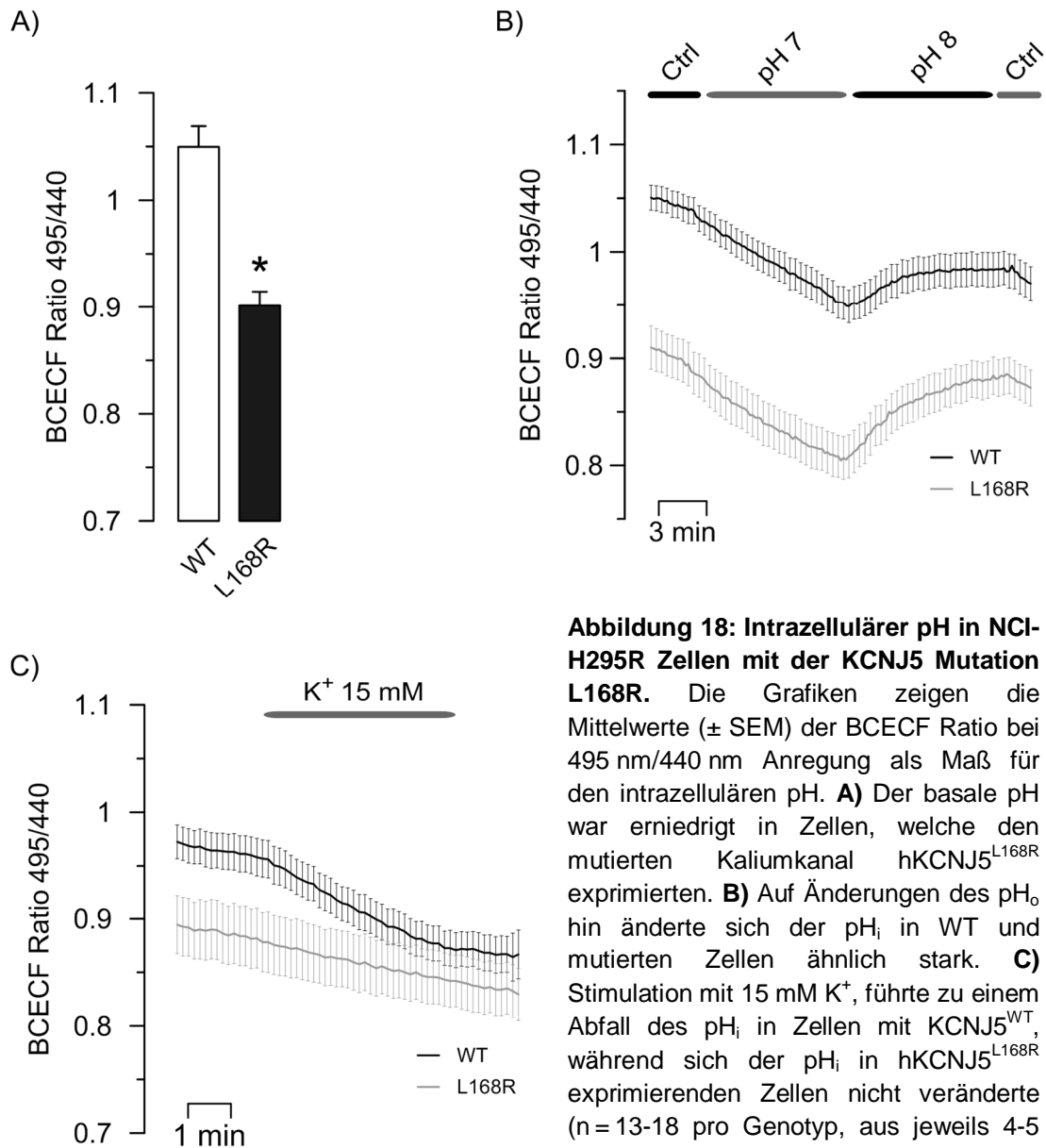


Abbildung 18: Intrazellulärer pH in NCI-H295R Zellen mit der KCNJ5 Mutation L168R. Die Grafiken zeigen die Mittelwerte (\pm SEM) der BCECF Ratio bei 495 nm/440 nm Anregung als Maß für den intrazellulären pH. **A)** Der basale pH war erniedrigt in Zellen, welche den mutierten Kaliumkanal hKCNJ5^{L168R} exprimierten. **B)** Auf Änderungen des pH_o hin änderte sich der pH_i in WT und mutierten Zellen ähnlich stark. **C)** Stimulation mit 15 mM K⁺, führte zu einem Abfall des pH_i in Zellen mit KCNJ5^{WT}, während sich der pH_i in hKCNJ5^{L168R} exprimierenden Zellen nicht veränderte (n = 13-18 pro Genotyp, aus jeweils 4-5 Messungen).

Da der intrazelluläre pH in den Zellen mit ATP1A1-Mutationen scheinbar eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung des Phänotyps spielt, stellten wir uns die Frage, ob die intrazelluläre Ansäuerung eine Gemeinsamkeit der in APAs gefundenen mutierten Membranproteine darstellt. Daher wurde der pH in NCI-H295R Zellen, die mit dem KCNJ5 WT und der Mutante L168R transfiziert wurden, bestimmt. Die Zellen,

welche die mutierte Form des Kanals exprimierten, hatten im Vergleich zum WT einen deutlich erniedrigten pH_i . Allerdings zeigten sie unter 15 mM K^+ keinerlei Veränderung des pH_i , ebenso fehlte die erhöhte Sensitivität auf Veränderungen des extrazellulären pHs bei pH 7 oder pH 8. Hier verhielten sich die hKCNJ5^{L168R} Zellen gleich wie hKCNJ5^{WT} Zellen.

3.8. Einfluss des intrazellulären pH auf die Expression der Aldosteronsynthese

Nachdem sowohl ATP1A1-Mutationen als auch die KCNJ5 Mutation den pH veränderten, stellten wir uns die Frage, ob der intrazelluläre pH die Aldosteronsekretion beeinflusst. Dazu wurden NCI-H295R Zellen 24 h in einem Zellkulturmedium inkubiert, welches mit 20 mM Na^+ -Azetat supplementiert wurde. Durch das Anlagern von H^+ -Ionen an das Azetat entsteht Essigsäure im Medium, diese diffundiert durch die Zellmembran in das Zytosol, hier dissoziiert die Säure wiederum und führt somit zu einer intrazellulären Ansäuerung ohne dass eine extrazelluläre pH Änderung notwendig ist. Dieses System wurde als Modell für den, durch die ATP1A1 L104R und V332G Mutationen hervorgerufenen Abfall des pH_i , verwendet. Diese „artifizielle“ Ansäuerung verursachte im Vergleich zu Kontrollzellen nach 24 h einen ähnlichen pH-Abfall, wie er durch die Mutationen der Na^+/K^+ -ATPase bzw. KCNJ5 hervorgerufen wurde. Des Weiteren konnte keine Veränderung des basalen Ca^{2+} -Levels detektiert werden, jedoch war ein abgeschwächten Ca^{2+} -Anstieg unter 15 mM K^+ zu beobachten. Der Einfluss des pH auf die Expression der Aldosteronsynthese wurde mittels qPCR bestimmt. Wie Abb. 19 C zeigt, führte die Stimulation mit Na^+ -Azetat zu einer 3,8-fachen Erhöhung der CYP11B2 Expression. Um zu testen, ob allein die Veränderung der extrazellulären Osmolarität die CYP11B2 mRNA Expression beeinflusst, wurden Zellen mit 20 mM NaCl im Medium stimuliert. Die Osmolaritätsänderung allein schien keine Wirkung auf die Expression der Aldosteronsynthese zu haben (Abb. 19 C).

Zusätzlich wurden weitere Versuche durchgeführt, bei welchen die Zellen 24 h mit einer extrazellulären Badlösung mit verschiedenen pH-Werten inkubiert wurden. Auch dies führte zu einer Erhöhung der CYP11B2 Expression bei extrazellulärem pH 7 und pH 6,5, bei pH 6 allerdings zu einer starken Reduzierung der CYP11B2 mRNA Expression auf etwa die Hälfte (Abb. 19 D).

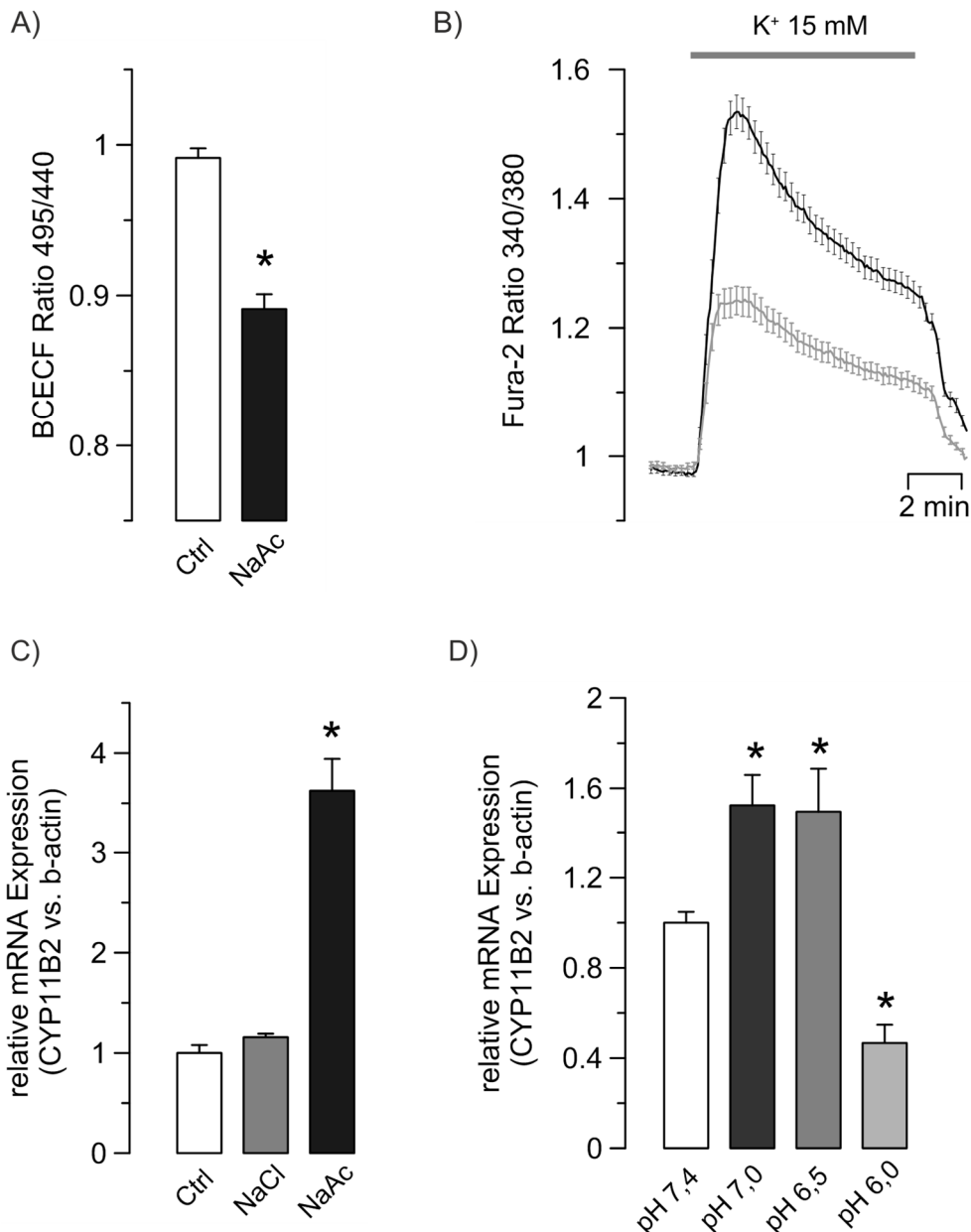


Abbildung 19: Effekt der zytosolischen Ansäuerung untransfizierter NCI-H295R Zellen durch Na⁺-Azetat oder Änderungen des extrazellulären pHs. A) 20 mM Na⁺-Azetat (NaAc) führte in NCI-H295R Zellen zu einem Abfall des intrazellulären pHs im Vergleich zu unbehandelten Zellen. **B)** Die Ansäuerung führte zu keiner Veränderung des basalen Ca²⁺-Levels, aber der Ca²⁺-Anstieg unter 15 mM K⁺ fiel geringer aus als in unbehandelten Zellen (n=39-43 aus je 3 Messungen). **C)** CYP11B2 mRNA Expression war in Zellen, die mit NaAc stimuliert wurden, erhöht im Vergleich zu unbehandelten Zellen und Zellen die 20 mM NaCl behandelt wurden. 20 mM NaCl hatte keinen Einfluss auf die CYP11B2 Expression. **D)** Intrazelluläre Ansäuerung durch eine Änderung des extrazellulären pHs auf pH 7 und 6,5 führte im Vergleich zu Kontrollzellen (pH 7,4) ebenfalls zu einem Anstieg der CYP11B2 mRNA in NCI-Zellen, eine Reduktion des pH auf pH 6 führte hingegen zu einem starken Abfall der CYP11B2 mRNA Expression (n = 5-6 aus 2 Messungen).

KAPITEL 4

DISKUSSION

Primärer Hyperaldosteronismus (PHA) ist die führende Ursache für die Entstehung der sekundären Hypertonie. Er zeichnet sich durch die autonome, von systemischen Stimuli unabhängige Sekretion des Mineralocorticoids Aldosteron aus. In etwa der Hälfte der PHA-Patienten ist ein unilaterales, Aldosteron-produzierendes Adenom (APA) der Grund für deren Erkrankung. Die pathophysiologischen Hintergründe, welche in den Adenomen zu einer gesteigerten Aldosteronproduktion führen, waren bis vor wenigen Jahren weitestgehend unverstanden. Erst durch die Exom-Sequenzierung von Adenomgewebe konnte festgestellt werden, dass der Pathologie von APAs somatische Mutationen in Genen, welche für Ionenkanäle (KCNJ5 und CACNA1D) und ATPasen (ATP2B3 und ATP1A1) kodieren, zu Grunde liegen. Die molekularen Mechanismen hinter der Entstehung der APAs wurden bisher nur für KCNJ5 Mutationen detaillierter untersucht. Hier führt ein pathologischer Na⁺-Einstrom zur Membrandepolarisation, die darauf folgende Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ induziert dann die Transkription der Aldosteronsynthase (Choi et al. 2011; Tauber et al. 2014; Kuppasamy et al. 2014).

Die pathophysiologischen Konsequenzen der ATP1A1-Mutationen hingegen sind noch weitgehend unerforscht. Das ATP1A1-Gen kodiert für die α1-Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase. Sechs verschiedene Mutationen sind in APAs gefunden worden (G99R, L104R, V332G, del100_104, EETA963S, del102_103 (Beuschlein et al. 2013; Azizan et al. 2013; Williams et al. 2014; Zheng et al. 2015)). Die hier betrachteten Mutationen

der Na⁺/K⁺-ATPase G99R, L104R, V332G liegen alle in der Nähe der Ionenbindedomäne bei Aminosäure Glu334 (s. Abb. 6). Sie verursachen eine veränderte Ionenaffinität, den Verlust der ATPase-Funktion und somit auch der Pumpfunktion. Zugleich verleihen die Mutationen L104R und V332G dem Protein vermutlich eine pathologische „gain-of-function“ (die G99R wurde darauf noch nicht analysiert). So konnten Azizan et al. einen pathologischen Na⁺- bzw. H⁺-abhängigen Einwärtsstrom für die V332G bzw. L104R in *Xenopus Laevis* Oozyten nachweisen. Die aktuellen Studien gingen hauptsächlich auf die Proteinfunktion der mutierten ATPasen auf Molekülebene ein und es gibt wenige Informationen über den Einfluss dieser Fehlfunktion auf die Zellphysiologie adrenaler Zellen. Erste Analysen wurden von Beuschlein et al. durchgeführt. Durch den elektrogenen Transport von Na⁺ und K⁺ und den Aufbau der Na⁺- und K⁺-Konzentrationsgradienten trägt die Na⁺/K⁺-ATPase zur Hyperpolarisation der Zellmembran bei. Ein Verlust dieser Pumpfunktion würde demnach zu einer Membrandepolarisation führen. In der Tat wiesen primäre Adenomzellen, in welchen ATP1A1-Mutationen gefunden wurden ein depolarisiertes Membranpotential auf. Ferner führte die Überexpression der L104R Mutation in HEK-293 Zellen zur Depolarisation, zum Teil durch einen pathologischen Na⁺-Einstrom verursacht. Dies führte die Autoren zu der Annahme, dass die ATP1A1-Mutationen über den gleichen Mechanismus wie die KCNJ5-Mutationen zur Aldosteronsekretion führen (Beuschlein et al. 2013), also über einen Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Levels.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Hypothese nachgegangen und erstmals die weiteren Auswirkungen der ATP1A1-Mutationen L104R, V332G und G99R auf die Zellphysiologie der adrenalen Zelllinie NCI-H295R im Detail betrachtet. Ich beobachtete, dass alle untersuchten ATP1A1-Mutationen zur Membrandepolarisation führten, dies das basale Ca²⁺-Level aber nicht signifikant veränderte. Meine Daten bestätigen zudem den beobachteten H⁺-Leckstrom der L104R Mutation, dies konnte ich entgegen der Vorhersagen erstmals auch für die V332G nachweisen. Ferner war in diesen Zellen der basale pH erniedrigt und die pH-Homöostase deutlich gestört. Interessanterweise stimulierte die gezielte Ansäuerung des Zytosols untransfizierter NCI-H295R Zellen die Expression der Aldosteronsynthase. Diese Daten lassen vermuten, dass der durch die ATP1A1-Mutationen hervorgerufene Pathomechanismus zur autonomen Aldosteronsekretion, anders als vermutet, nicht oder nicht nur über Ca²⁺-abhängige Wege vermittelt ist und dass der pathologische H⁺-Einstrom eine relevante Rolle dabei spielt.

4.1. Charakterisierung der ATP1A1-Mutationen G99R und V332G in HEK-Zellen

In dieser Arbeit wurden zunächst die Mutation G99R und die bereits bekannte Mutation V332G in überexprimierenden HEK-Zellen elektrophysiologisch genauer analysiert. Im Zuge der Kollaboration mit Dr. Tracy Ann Williams (Division of Internal Medicine and Hypertension, Department of Medical Sciences, University of Torino, Torino) stellten wir fest, dass die Mutation G99R, ebenso wie die V332G Mutation, zur Membrandepolarisation führte. Wir vermuteten, dass die Mutationen, ähnlich wie die bereits analysierte L104R Mutation, auch zu einem pathologischen Na^+ -Einstrom führen, der einen depolarisierenden Einfluss auf die Zelle hat. Dementsprechend sollte das Membranpotenzial in Zellen, welche die mutierte Na^+/K^+ -ATPase exprimieren, unter extrazellulären Na^+ -freien Bedingungen auf ein ähnliches Level wie der WT hyperpolarisieren. Wir haben dies für die Mutation V332G beobachten können. Dies bestätigt die Befunde von Azizan et al. in *Xenopus laevis* Oozyten, die einen Na^+ -abhängigen Leckstrom durch diese Mutation identifizierten. Obwohl die Mutation G99R nicht weit entfernt von der L104R lokalisiert ist, verursachte sie keine Na^+ -abhängige Depolarisation. Die Membrandepolarisation in diesen Zellen beruht vermutlich eher auf der gestörten intrazellulären Ionenhomöostase, hervorgerufen durch den Verlust der Pumpfunktion, und weniger auf einer pathologischen „gain-of-function“.

4.2. Gestörte intrazelluläre Ionenhomöostase und pathologische Membrandepolarisation in adrenalen Zellen mit ATP1A1_{mut}

Um den Einfluss der Mutationen auf Nebennierenzellen genauer zu untersuchen, wurde für weitere Experimente die aus einem Nebennierenkarzinom stammende Zelllinie NCI-H295R verwendet. Auf eine Kotransfektion mit der β -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase wurde hier verzichtet. Da die Interaktion zwischen α - und β -Untereinheit unabdingbar für die Bildung des aktiven Proteinkomplexes ist, ist die Expression der endogenen β -Untereinheit limitierend für die Expression der transfizierten α -Untereinheit. Dadurch wird eine „zu starke“ Überexpression der transfizierten Untereinheit verhindert und ermöglicht eine zuverlässigere Analyse der Zellphysiologie. Gleichzeitig konkurriert vermutlich die endogene mit der transfizierten $\alpha 1$ -Untereinheit um die Interaktion mit der β -Untereinheit. Dies könnte zu einer verringerten Expression des intakten, endogenen Proteins führen. Die reduzierte endogene Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität kann mit einer funktionellen Haploinsuffizienz

verglichen werden (in Zellen welche die mutierten Proteine exprimieren), ähnlich wie in den mutierten Adenomzellen, welche heterozygot für die ATP1A1-Mutationen sind.

Wie die Daten der Flammenphotometrie zeigen, führte die Expression der Na⁺/K⁺-ATPase Mutationen zu einer gestörten intrazellulären Ionenhomöostase in NCI-H295R Zellen. Die mutierten Zellen hatten eine erhöhte intrazelluläre Na⁺- und eine erniedrigte K⁺-Konzentration im Vergleich zu WT überexprimierenden Zellen. Der Effekt auf die gemessenen Konzentrationen ist vermutlich sogar noch extremer, da in unserem Zellmodell lediglich eine Transfektionseffizienz von ca. 20 % erreicht wurde. Dem entsprechend maskierten die nicht-transfizierten Zellen in der Kultur wahrscheinlich die Effekte der transfizierten, ATP1A1_{mut} exprimierenden Zellen.

Die veränderte Na⁺- und K⁺- Konzentration könnte auf eine reduzierte Aktivität der endogenen Na⁺/K⁺-ATPasen zurückzuführen sein deren Pumpleistung nicht ausreichend ist, um den Ausfall der mutierten ATPasen in vollem Ausmaß zu kompensieren: Na⁺ reichert sich zytosolisch an und die K⁺-Konzentration fällt ab. Es ist ebenfalls möglich, dass der pathologische Na⁺-Einstrom durch das mutierte Protein (L104R, V332G) zur Erhöhung der Na⁺-Konzentration beiträgt. Wurden die endogenen ATPasen durch Ouabain geblockt, erhöhte sich die intrazelluläre Na⁺-Konzentration drastisch und die K⁺-Konzentration fiel auf etwa ein Fünftel des Normalwertes. In den WT-Zellen war keine Umkehr des Verhältnisses von Na⁺ und K⁺ zu beobachten, dennoch stieg die Na⁺-Konzentration an und die K⁺-Konzentration fiel ab. Dass in den WT-transfizierten Zellen nach Ouabaingabe die Na⁺- und K⁺-Konzentration nicht gleichbleibend wie unter Kontrollbedingungen war, ist durch die nicht-transfizierten Zellen im Lysat zu erklären, welche ausschließlich die endogene ATPase exprimierten. Stimulation mit Ouabain führt in diesen Zellen zum Anstieg des Na⁺ und Abfall des K⁺, somit verfälschen sie die tatsächlichen (vermutlich „normalen“) Ionen-Konzentrationen in den transfizierten Zellen mit der Ouabain-resistenten WT Na⁺/K⁺-ATPase. Dies bestätigt zum einen die bisherigen Befunde, dass die Mutationen zu einem Verlust der Pumpfunktion führen und zeigt zum anderen, dass die transfizierte WT-Untereinheit der Ratten-Na⁺/K⁺-ATPase ein funktionsfähiges Protein mit der endogenen β-Untereinheit in den humanen NCI-H295R Zellen bildete.

Die veränderte Ionenhomöostase könnte das depolarisierte Ruhemembranpotenzial in ATP1A1_{mut} exprimierenden Zellen erklären. Auf Grund der Tatsache, dass in Glomerulosazellen das Membranpotenzial im Wesentlichen vom transmembrären K⁺-Gradienten abhängig ist, würde eine Erniedrigung der intrazellulären K⁺-Konzentration, dem veränderten Nernstpotenzial entsprechend, zu einer Depolarisation der NCI-H295R Zellen führen. Zusätzlich wirkt ein pathologischer Na⁺-Einstrom durch die

L104R und V332G Mutanten depolarisierend auf das Membranpotenzial. Des Weiteren konnte in Aldosteron-produzierenden Adenomen eine geringere Expression des Hintergrund-Kaliumkanals TASK-2 nachgewiesen werden (Lenzini et al. 2014). Eine geringere Aktivität dieser Kanäle führt zu einer Depolarisation der Plasmamembran von Glomerulosazellen, dies könnte auch in NCI-H295R depolarisierend auf das Ruhemembranpotenzial wirken. Allerdings wurde nicht aufgezeigt, ob Adenome mit inhibierter TASK-2-Expression auch ATP1A1-Mutationen trugen.

4.3. Erhöhte Aldosteronsekretion trotz unverändertem basalen Ca^{2+} -Level in adrenalen Zellen

Entsprechend ihres Depolarisationsgrades sezernierten die transfizierten Zellen vermehrt Aldosteron, so zeigten L104R exprimierende NCI-H295R Zellen die stärkste Depolarisation und die höchste Aldosteronproduktion. Neben einer erhöhten CYP11B2 mRNA-Expression, welche mit dem Level der Aldosteronsekretion korrelierte, konnte ich erhöhte HSD3B2 mRNA-Level in Zellen mit L104R, V332G und G99R Mutationen detektieren. Auffallend war, dass die L104R Mutation auch hier den stärksten Phänotyp hervorrief, fast alle Enzyme des Aldosteronbiosynthesewegs waren hochreguliert. Diese Daten zeigen, dass alle drei Mutationen zu einer autonomen Sekretion von Aldosteron führten, die Grundlage für einen primären Hyperaldosteronismus. Die unterschiedliche Regulation der Genexpression durch die einzelnen Mutationen lässt allerdings vermuten, dass hier eventuell auch unterschiedliche Pathomechanismen zusammenspielen. Unter physiologischen Bedingungen stimuliert Ang II die Transkription der HSD3B2 und der CYP11B2 in Glomerulosazellen, u. a. durch die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Levels. Ähnlich wie bei den bereits analysierten KCNJ5-Mutationen ist es durchaus möglich, dass auch in Zellen mit den ATP1A1-Mutationen die Membrandepolarisation den Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle aktiviert und dadurch die Transkription der HSD3B2 und der CYP11B2 induziert. Allerdings scheint der Pathomechanismus hinter den ATP1A1-Mutanten komplexer zu sein, da keine offensichtlichen Veränderungen des basalen Ca^{2+} -Levels Zellen mit ATP1A1-Mutationen detektiert werden konnten. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Ein dauerhaft erhöhtes Ca^{2+} -Level wirkt zellschädigend, daher verfügen Zellen über eine umfängliche Maschinerie, die das basale Ca^{2+} -Level auf einem konstant niedrigen Niveau hält: Zum einen könnten Ca^{2+} -Exportmechanismen, wie z. B. die Plasma-Membran- Ca^{2+} -ATPasen (PMCA), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -

Austauscher (NCX) und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -Austauscher (NCKX), in diesen Zellen verstärkt aktiviert sein, um dem Ca^{2+} -Einstrom entgegenzuwirken. Es ist ebenfalls möglich, dass die starke Depolarisation, hervorgerufen durch die ATP1A1-Mutationen, die spannungsaktivierten Ca^{2+} -Kanäle dauerhaft inaktiviert. In chromaffinen Zellen führt eine chronische Depolarisation zur Hemmung der mRNA-Expression spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (Feron et al. 1995), um den anhaltenden Ca^{2+} -Einstrom zu verhindern, ein Mechanismus, welcher in chronisch depolarisierten NCI-H295R Zellen ebenfalls vorstellbar ist. Es wurde ferner beobachtet, dass intrazelluläre Ansäuerung T- und L-Typ Ca^{2+} -Kanalströme in Neuronen und Cardiomyozyten inhibiert (Tytgat et al. 1990; Tombaugh et al. 1997) und womöglich in ATP1A1 L104R und V332G exprimierenden Zellen die Ca^{2+} -Kanalaktivität zusätzlich reduziert.

Diese Daten stehen im Gegensatz zu bisherigen Erkenntnissen über APA-assoziierte Mutationen des Kaliumkanals KCNJ5. Dort kommt es zu einem Anstieg des basalen Ca^{2+} -Levels (Oki et al. 2012; Kuppusamy et al. 2014; Tauber et al. 2014). Es ist davon auszugehen, dass auch hier eine ähnliche Maschinerie aktiviert wird, um einen zu starken Anstieg des Ca^{2+} zu verhindern. Anders als die ATP1A1-Mutationen allerdings, führen die Mutationen des KCNJ5 zu einem pathologischen Ca^{2+} -Leckstrom (Scholl et al. 2012) und zu einer wesentlich stärkeren Depolarisation der Zellmembran, was eine Normalisierung der Ca^{2+} -Aktivität erschwert. Hier schlussfolgerten die Autoren, dass die übermäßige Aldosteronproduktion auf die Ca^{2+} -induzierte CYP11B2-Expression zurückführen ist, ein Signalweg, welcher wohl nicht den Hauptweg bei ATP1A1-Mutationen darstellt.

Wie in der Einleitung vorgestellt, kann die Aldosteronsynthese ebenfalls über Ca^{2+} -unabhängige Kaskaden reguliert werden, darunter der an die Na^+/K^+ -ATPase gekoppelte Src-Kinase-Signalweg. Die inaktive Src-Kinase ist zytosolisch an die Na^+/K^+ -ATPase gebunden und wird über eine Konformationsänderung der Pumpe freigesetzt und aktiviert (Tian et al. 2006; Ye et al. 2013). Eine solche Aktivierung erfolgt z. B. durch die Bindung an Ouabain. Ouabain ist ein Blocker der Na^+/K^+ -ATPase und induziert eine Konformationsänderung, bei welcher der K^+ -gebundene E2-Status der Na^+/K^+ -ATPase „eingefroren“ wird, dadurch die ATPase-Funktion inhibiert. Die analysierten Mutationen haben einen ähnlichen Effekt auf die Na^+ -Pumpe, die Proteine sind weiterhin in der Lage K^+ zu binden, haben allerdings ihre ATPase-Funktion verloren (Beuschlein et al. 2013; Williams et al. 2014). Es ist durchaus vorstellbar, dass die Mutationen die Konformation des Proteins ähnlich beeinflussen wie Ouabain, so dass die Src-Kinase nicht mehr gebunden werden kann, damit dauerhaft aktiviert ist und über *downstream* Effektoren die Aldosteronsynthese ankurbelt.

4.4. Veränderte Zellantwort auf die Stimuli Ang II und K^+ in ATP1A1_{mut} exprimierenden Zellen

Da sowohl das Membranpotenzial, als auch (vermutlich) die Ca^{2+} -Regulation der Zellen durch die Expression der ATP1A1_{mut} beeinflusst sind, untersuchte ich zusätzlich die Zellantwort auf die klassischen Stimuli der Aldosteronsekretion: Hyperkaliämie und Angiotensin II. Beides führt in Glomerulosazellen normalerweise zur Depolarisation der Zellmembran und aktiviert intrazelluläre Ca^{2+} -Signalwege.

Die konstitutiv geöffneten K^+ -Hintergrundkanäle in den Glomerulosazellen verleihen ihnen eine bemerkenswerte Sensitivität für Veränderung des transmembrären K^+ -Gradienten, dementsprechend sind sie unter normokaliämischen Bedingungen stark hyperpolarisiert und depolarisieren bei Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration. Diese Depolarisation bewirkt die Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und einen Ca^{2+} -Einstrom. Die Stimulation mit 15 mM K^+ depolarisierte sowohl WT-Zellen als auch G99R exprimierende Zellen. Im Gegensatz dazu wurde das Membranpotential in L104R und V332G exprimierenden Zellen durch die K^+ -Stimulation kaum beeinflusst. Korrelierend dazu erhöhte sich das intrazelluläre Ca^{2+} nur in WT und G99R transfizierten Zellen, der Anstieg war deutlich vermindert in Zellen mit den L104R und V332G Mutationen. Es scheint, dass die Expression der L104R und V332G Mutanten zu einer verminderten K^+ -Sensitivität der adrenalen Zellen führte. Eine geringere Leitfähigkeit für K^+ könnte ein Grund dafür sein. Dies kann zum einen durch eine reduzierte fraktionelle K^+ -Leitfähigkeit durch die zusätzlichen pathologischen Leckströme (Na^+ und/oder H^+), die zur Gesamtleitfähigkeit der Zelle beitragen, hervorgerufen werden. Zum anderen könnte eine inhibierte Expression der Hintergrund-Kaliumkanäle zusätzlich zu einer geringeren Kalium-Sensitivität beitragen. Zusätzlich wurde die Zellantwort auf Ang II analysiert. Die Stimulation mit Ang II führte in WT exprimierenden NCI-H295R Zellen zu einer transienten Hyperpolarisation gefolgt von einer konstanten Depolarisation. Beides konnte in NCI-H295R Zellen, welche die mutierten Na^+/K^+ -ATPasen exprimierten, ebenfalls beobachtet werden. Während kein Unterschied in der Hyperpolarisationsphase zwischen WT und den Mutanten zu sehen war, war die Depolarisation in mutierten Zellen schwächer ausgeprägt. Die elektrophysiologische Antwort auf Ang II in NCI-H295R Zellen wurde meines Wissens in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Interessanterweise zeigen Studien an murinen, bovinen als auch humanen primären Zellen der Zona glomerulosa nur eine Depolarisation während der Stimulation mit Ang II (Brauneis et al. 1991; Penton 2011). Allerdings wurde eine unseren Daten ähnliche Antwort in bovinen

Fasciculatazellen gezeigt, und die transiente Hyperpolarisation konnte auf eine Aktivierung des Maxi-K zurückgeführt werden (Chorvatova et al. 1998). Da NCI-H295R Zellen sowohl glomerulosa- und fasciculata-ähnlichen Eigenschaften aufweisen, könnte die beobachtete Hyperpolarisation ebenfalls durch eine transiente Ca^{2+} -abhängige Aktivierung des Maxi-K verursacht sein. Die durch Ang II-induzierte Depolarisation hingegen wird durch die Inhibierung der K^+ -Leitfähigkeit (zum einen der K^+ -Hintergrundkanäle und zum anderen des Maxi-K (Guagliardo et al. 2012) und einer Reduzierung der Na^+/K^+ -ATPase Aktivität hervorgerufen. Scheinbar beeinflussen diese Mechanismen in Zellen, welche die mutierte Na^+/K^+ -ATPase exprimieren, das Membranpotenzial weniger effektiv oder treten hier erst gar nicht in Erscheinung. Diese Daten unterstützen die aufgestellte Vermutung, dass die fraktionelle K^+ -Leitfähigkeit der Hintergrundkaliumkanäle verringert ist, so dass deren Hemmung weniger depolarisierend wirkt und dass in $\text{ATP1A1}_{\text{mut}}$ Zellen der Maxi-K verstärkt aktiviert sein könnte und der Depolarisation entgegenwirkt. Des Weiteren führen die Mutationen selbst bereits zu einer Inhibierung der Na^+/K^+ -ATPase, dementsprechend würde die zusätzliche durch Ang II bedingte Hemmung der restlichen ATPasen ebenfalls weniger Einfluss auf das Membranpotenzial haben.

Neben einer veränderten elektrophysiologischen Antwort sind die Ca^{2+} -Signalwege unter Ang II ebenfalls gestört. Die Stimulation mit Ang II rief zwar in allen Zellen die erwartete Peak-Plateau-Antwort hervor, aber die Mutationen führten sowohl zu einem schnelleren Abfall des Ca^{2+} -Peaks, als auch zu einem geringeren Ca^{2+} -Level in der Plateauphase. Letzteres lässt sich durch die verminderte Membrandepolarisation erklären und den dadurch ausbleibenden Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle. Der schnellere Abfall des Ca^{2+} nach Erreichen des Peaks spricht zusätzlich dafür, dass die Ca^{2+} -Extrusionsmechanismen in diesen Zellen verstärkt aktiv sind. Azizan et al. haben gezeigt, dass Zellen, welche die L104R Mutante exprimierten, einen geringeren Anstieg der Aldosteronsekretion nach Stimulation mit Ang II aufwiesen. Die verminderte Ca^{2+} -Aktivität während der Plateauphase könnte dies erklären, da ein erhöhtes Ca^{2+} -Level in dieser Phase essentiell für die Ang II aktivierte Aldosteronsekretion ist. In Übereinstimmung dazu zeigten Zellen mit KCNJ5 Mutation ebenfalls ein gestörtes Ca^{2+} -Signaling unter Ang II (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise bleibt bei einem Großteil der APA-Patienten der Anstieg des Plasma-Aldosterons bei einem Anstieg des Plasma-Angiotensins aus (entweder im Aldosteron-Orthostase-Test oder bei direkter Ang II Infusion (Carey et al. 1979; Stowasser et al. 2010)). Hier wäre es interessant zu untersuchen inwiefern dies mit dem Vorhandensein einer der bekannten APA-assoziierten Mutationen korreliert.

Womöglich hängt dieser Phänotyp mit dem pathologischen Signaling in Adenomzellen zusammen, welche eine der Mutationen tragen.

4.5. Gestörte intrazelluläre pH-Regulation durch Mutationen der Na^+/K^+ -ATPase

Nachdem das basale Ca^{2+} -Level in Zellen, welche die ATP1A1-Mutationen trugen, nicht chronisch erhöht war, könnte es eventuell weitere Mechanismen geben, welche die Aldosteronsekretion in diesen Zellen verstärken. Azizan et al. vermuteten auf Grund ihrer elektrophysiologischen Daten in Oozyten von *Xenopus Laevis*, dass zumindest die Mutation L104R einen H^+ -abhängigen Leckstrom hervorruft (Azizan et al. 2013). Diese Vermutung wurde durch Molekulardynamik-Simulationen von Kopec et al. bestärkt (Kopec et al. 2014). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte ich in dieser Studie beobachten, dass die Expression der Na^+/K^+ -ATPase Mutante L104R zu einer Erhöhung der intrazellulären H^+ -Konzentration in NCI-H295R Zellen führte und zusätzlich die pH-Regulation der Zellen erheblich beeinflusste; zudem stellte ich dies ebenfalls für die V332G Mutante fest. Wurden die angesäuerten L104R und V332G exprimierenden Zellen durch Änderungen des extrazellulären pHs gestresst, zeigte deren pH_i auffällig starke Änderungen entsprechend der extrazellulären pH-Änderungen, während WT- und G99R-Zellen nur geringe Änderungen des zytosolischen pH-Levels aufwiesen. Dies ist ein Hinweis auf den pathologischen H^+ -Leckstrom in diesen Zellen. Die Ansäuerung der Badlösung auf pH 7 verstärkte die Triebkraft für H^+ -Ionen in die Zelle zu strömen. Somit säuerten Zellen, welche diese Na^+/K^+ -ATPase Mutanten L104R und V332G exprimierten, schneller an als Wildtypzellen. Ähnlich verhielt es sich bei einer Alkalisierung des extrazellulären Milieus: Auf Grund einer verminderten H^+ -Triebkraft in die Zelle und einer höheren Extrusion der H^+ -Ionen (vermutlich durch die verstärkte Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers in der Plasmamembran s. U.) stieg der intrazelluläre pH in V332G und L104R exprimierenden Zellen schnell und auffallend stark an. Dass die übermäßige Alkalisierung dieser Zellen zum Teil durch Na^+ -abhängige Extrusionsmechanismen getragen wurde, zeigte der ausbleibende pH-Anstieg unter extrazellulären Na^+ -freien Bedingungen bei pH 8. Fehlt extrazelluläres Na^+ , fehlt die Triebkraft für die meisten dieser Transporter. Interessanterweise fiel der basale pH unter Na^+ -freien Bedingungen nach 48 h wesentlich stärker ab, als nach 24 h, was darauf deutet, dass die Aktivität der Na^+ -abhängigen, pH-regulierenden Mechanismen stetig hochreguliert

wird, um dem anhaltenden H^+ -Leckstrom entgegen zu wirken. Es ist sehr wahrscheinlich, dass eine erhöhte Grundaktivität des NHE in diesen Zellen einen wesentlichen Anteil an den beobachteten Effekten trägt.

Die kritische Rolle des NHE in NCI-H295R Zellen mit der L104R mutierten Na^+/K^+ -ATPase zeigt sich nach der spezifische Hemmung des NHE1 durch Cariporid. Während dieser Block auf Wildtyp Zellen keinen Einfluss hatte, führte Cariporid in den Mutanten zur weiteren Ansäuerung des basalen pH-Levels und dem gleichzeitigen Anstieg des Ca^{2+} -Levels. Letzterem könnte die vorher besprochene übermäßige Aktivierung der Ca^{2+} -Extrusionsmechanismen zu Grunde liegen, um genauer zu sein, der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA). Die PMCA ist ein Ca^{2+}/H^+ -Antiporter, sie transportiert unter ATP-Verbrauch Ca^{2+} über die Plasmamembran aus dem Zytosol und H^+ in das Zytosol (Thomas 2009; Boczek et al. 2014). Da der Pumpmechanismus vom H^+ -Gradienten abhängig ist, würde ein Anstieg der intrazellulären H^+ -Konzentrationen inhibierend auf die PMCA wirken. Die Ansäuerung nach Inhibition des NHE könnte demnach die PMCA-Aktivität hemmen und zum Anstieg des Ca^{2+} -Levels führen. Der intrazelluläre pH beeinflusst außerdem Ca^{2+} -bindende Proteine. Es wird vermutet, dass im sauren pH Ca^{2+} weniger effektiv gebunden werden kann (Iida et al. 1986). Ein Abfall des pH würde demnach zur Freisetzung von gebundenem Ca^{2+} führen und das zytosolische Level an (messbarem) freiem Ca^{2+} erhöhen. Die kompensatorische Hochregulation der NHE-Aktivität ist demnach essentiell für die Aufrechterhaltung eines normalen Ca^{2+} -Levels und eines pH-Levels, das sich im physiologischen Bereich befindet. Die verstärkte NHE-Aktivität wird vermutlich in diesen Zellen hauptsächlich durch posttranskriptionelle Regulation erreicht, da keinerlei Veränderung in dessen mRNA-Expression festgestellt werden konnte.

Aufschlussreich war die gegenläufige pH-Antwort von Zellen mit der L104R bzw. V332G Mutation im Vergleich zu WT bzw. G99R exprimierenden Zellen durch die Stimulation mit extrazellulärer K^+ -Erhöhung. In WT und G99R exprimierenden Zellen war der erwartete Abfall des pH_i zu beobachten (Conlin et al. 1993). Durch den K^+ -induzierten Anstieg des Ca^{2+} -Levels über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle wird vermutlich die PMCA verstärkt aktiviert und die intrazellulären H^+ -Konzentration steigt an, dadurch kommt es zu dem beobachteten Abfall des pH_i (Thomas 2009; Boczek et al. 2014). Im Gegensatz dazu stieg der pH_i in den L104R- und V332G exprimierenden Zellen an. Diese Beobachtung unterstützt den Befund von Azizan et al., dass extrazelluläres K^+ hemmend auf den H^+ -Leckstrom wirkt (Azizan et al. 2013) und ist zugleich ein indirekter Nachweis für diesen. Bleibt der pathologische H^+ -Einstrom aus, hat der konstant aktivierte NHE nun die Möglichkeit den intrazellulären pH zu

„normalisieren“. Anders als die genannten Mutationen führte die G99R nicht zu einer intrazellulären Ansäuerung. Es scheint, dass diese Mutation auch wenn sie sich in der Nähe der L104R Mutation befindet, keinen H^+ -Leckstrom verursacht.

Bemerkenswert ist, dass die Expression der APA-assoziierten $KCNJ5^{L168R}$ Mutante auch zu einem Abfall des intrazellulären pH führte. Allerdings zeigten die Zellen keine auffälligen pH-Schwankungen unter verschiedenen extrazellulären pH-Werten und ebenfalls keinen Anstieg unter 15 mM K^+ , was dafür spricht, dass diese Mutation keinen H^+ -Leckstrom verursacht und womöglich keine erhöhte Aktivität des NHE. Die intrazelluläre Ansäuerung kommt vermutlich durch die gesteigerte Aktivität der PMCA's zustande, um den Ca^{2+} -Einstrom auf Grund der starken Membrandepolarisation und den zusätzlichen Ca^{2+} -Leckstrom durch die Mutante zu kompensieren.

4.6. Trägt die zytosolische Ansäuerung zur pathologischen Aldosteronsekretion bei?

Wir spekulierten, ob nicht der intrazelluläre pH allein bereits die Aldosteronsynthese modifiziert. Um die Hypothese zu testen, etablierte ich ein Zellmodell, welches das intrazelluläre Milieu in untransfizierten adrenalen NCI-H295R Zellen ansäuerte, ohne dass der extrazelluläre pH verändert werden muss. Dies kann durch die Stimulation der Zellen mit 20 mM Na^+ -Azetat (NaAc) im Zellkulturmedium erreicht werden. Im Medium bindet ein H^+ an das Azetat und es bildet sich die membranpermeable Essigsäure (HAc), im Zytosol diffundiert das H^+ wieder vom Acetat ab und erniedrigt somit den pH_i . Die dadurch angesäuerten untransfizierten NCI-H295R Zellen zeigten einen Anstieg der CYP11B2 mRNA Expression um etwa das 3,5-fache und es konnte ebenfalls ein erhöhtes Aldosteronlevel im Zellkulturmedium angesäuerter Zellen detektiert werden (weiterführende Arbeiten von Dr. Sascha Bandulik). Die Zugabe von 20 mM NaCl hatte keinen Einfluss auf die CYP11B2 mRNA Expression, das heißt der beobachtete Effekt durch NaAc war unabhängig von der Änderung der extrazellulären Osmolarität. Der Anstieg der Aldosteronsynthese war ebenfalls unabhängig vom intrazellulären Ca^{2+} , da das basale Ca^{2+} -Level ähnlich dem der unbehandelten Zellen war. Zudem hatten diese Zellen unter 15 mM K^+ ein ähnlich verändertes Ca^{2+} -Signaling wie Zellen mit den ATP1A1-Mutanten L104R und V332G. Diese Daten unterstützen die Vermutung, dass eine intrazelluläre Ansäuerung spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle inhibieren könnte.

Zusätzlich wurden Experimente durchgeführt, bei welchen der extrazelluläre pH definiert herabgesetzt wurde. Diese Änderung führt ebenfalls zu einem Abfall des zytosolischen pH-Wertes. Die mRNA der CYP11B2 war hochreguliert bei Stimulation mit pH 7 und 6,5. Ähnliche Effekte auf die Steroidsynthese konnten bereits in primären Glomerulosazellen festgestellt werden, allerdings gingen sie mit einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Levels einher (Kramer et al. 2000). Grund für eine Ca^{2+} -Erhöhung bei Azidose sind die pH-sensitiven Hintergrundkanäle in Glomerulosazellen, sie werden durch Ansäuern des pH_o inhibiert und wirken so depolarisierend. Der Einfluss extrazellulären pHs auf das Membranpotenzial in NCI-H295R Zellen ist zwar nicht bekannt, es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass eine Erhöhung des Ca^{2+} durch Membrandepolarisation bei dem hier beobachteten Anstieg der CYP11B2 mRNA involviert ist. Interessanterweise induzierte eine weitere Ansäuerung auf pH 6 einen starken Abfall der CYP11B2 mRNA Expression. In Übereinstimmung damit konnten Conlin et al. zeigen, dass die K^+ -induzierte Aldosteronsekretion nach Hemmung des NHEs geblockt wurde, obwohl der Ca^{2+} -Einstrom im Vergleich zu Kontrollzellen gleichbleibend erhöht war (Conlin et al. 1993). Wie die hier vorgestellten Daten zeigen, intensiviert die Hemmung des NHE den Abfall des pH_i unter 15 mM K^+ . Zusammengefasst unterstreichen die Daten die Vermutung, dass die gestörte pH-Homöostase zum Phänotyp der APA-assoziierten ATP1A1-Mutationen beiträgt. Es bleibt noch offen über welche intrazellulären Mechanismen genau die H^+ -Konzentration die Transkription des CYP11B2-Gens moduliert, unsere Befunde erlauben jedoch neue Einblicke in die Komplexität der Regulationsmaschinerie der Aldosteronsekretion. *In vivo* weist das intratumorale Milieu meist einen deutlich angesäuerten pH-Wert auf. Da die Blutversorgung von Tumoren oft eingeschränkt ist, bedienen sich die Tumorzellen der anaeroben Glykolyse zur Energiegewinnung. Die dabei entstehende Milchsäure wird exportiert, akkumuliert extrazellulär und ist verantwortlich für den Abfall des pH_o (Tannock et al. 1989). Unter Berücksichtigung dieser Umstände und zusammen mit der erhöhten pH-Labilität durch die Expression der ATP1A1 L104R bzw. V332G Mutation, haben die adrenalen Adenomzellen *in vivo* vermutlich sogar einen etwas niedrigeren pH_i als die *in vitro* Daten zeigen, was die autonome Aldosteronsekretion eventuell noch stärker antreibt.

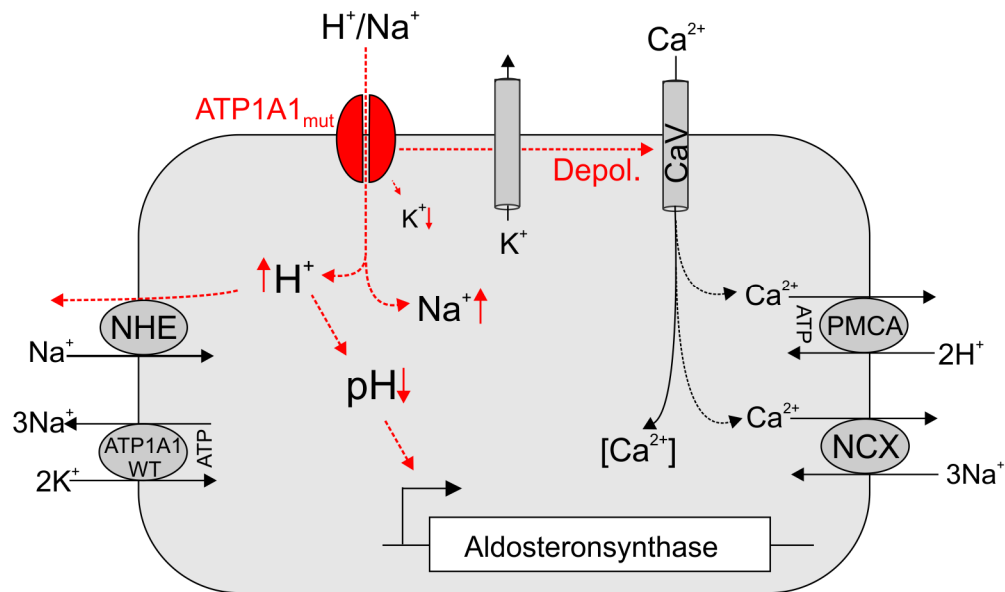


Abbildung 20: Schema der zellulären Pathophysiologie ATP1A1_{mut} exprimierender adrenaler Zellen. Die mutierte Na⁺/K⁺-ATPase tauscht nicht wie der ATP1A1-WT Na⁺ gegen K⁺ aus und führt dadurch zu einem Anstieg der intrazellulären Na⁺- und einem Abfall der K⁺-Konzentration, zusätzlich weisen sie einen pathologischen Na⁺- und H⁺-Leckstrom auf (L104R, V332G). Der H⁺-Einstrom bewirkt den Abfall des intrazellulären pHs, welcher die Aldosteronsekretion stimuliert. Zudem aktiviert die Ansäuerung den Na⁺/H⁺-Austauscher (NHE), welcher ein H⁺ gegen ein Na⁺ austauscht. Die Mutationen depolarisieren außerdem die Zellmembran. Verantwortlich dafür können der pathologische Na⁺-Einstrom, die verminderte zytosolische K⁺-Konzentration und die verminderte Aktivität der endogenen Na⁺/K⁺-ATPase (ATP1A1-WT) durch Haploinsuffizienz sein. Trotz Depolarisation scheint das basale Ca²⁺-Level normal zu bleiben, vermutlich durch die Inaktivierung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle (CaV) und/oder der Aktivierung von Ca²⁺-Exportmechanismen wie den Plasmamembran-Ca²⁺-ATPasen (PMCA) und der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX).

Die Mutation G99R stimulierte trotz unveränderter pH-Homöostase die autonome Aldosteronsekretion. Der Pathomechanismus hinter dieser Mutation könnte hauptsächlich auf die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, welche unabhängig von der Ionentransportfunktion die Aldosteronsekretion induzieren, zurückzuführen sein (s. Kapitel 1.5). Diese Mechanismen können sicherlich auch für die Mutationen L104R und V332G zutreffen. So wäre die erwähnte Aktivierung der Src-Kinase ein möglicher Link zur Aldosteronproduktion, womöglich über die Aktivierung von β -Catenin (Karni et al. 2005; Berthon et al. 2010). Eine Hochregulation des β -Catenin-Signalwegs konnte in der Mehrheit von APAs gefunden werden und induziert die mRNA Expression von CYP11B2 und der CYP21A2 (welche in Zellen mit den Mutationen G99R und L104R signifikant erhöht und in V332G leicht erhöht war) (Berthon et al. 2014). Es ist auch möglich, dass die erhöhte Na⁺-Konzentration und

deren sekundäre Folgen in den NCI-H295R Zellen, welche die Atp1a1-Mutationen tragen, der Trigger für die autonome Aldosteronsekretion sind, oder zusätzlich regulierend wirken (van der Bent et al. 2014). Allerdings war im Vergleich zu L104R und V332G exprimierenden Zellen der Phänotyp durch die G99R Mutation relativ mild. Warum dies der Fall ist, bleibt noch zu beantworten. Es könnte aber der pathologische H⁺-Leckstrom und die dadurch veränderte pH-Regulation sein, die den Phänotyp der anderen Mutationen zusätzlich verschärft. Die pH-Abhängigkeit der Aldosteronsekretion öffnet womöglich neue Möglichkeiten zur Diagnose und Therapie von APAs.

4.7. Ausblick

Die Beobachtung, dass ATP1A1-Mutationen ursächlich für die Entstehung eines primären Hyperaldosteronismus sind, konnte mit dieser Studie weiter gestützt werden. Allerdings scheint dies nicht durch ein erhöhtes basales Ca²⁺-Level in mutierten Zellen hervorgerufen zu werden, sondern viel mehr durch die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden und einer veränderten pH-Homöostase. Der Befund, dass die Aldosteronsekretion über eine intrazelluläre Ansäuerung aktiviert werden kann, öffnet einen neuen Blickwinkel auf die Regulationsmechanismen der Aldosteronsynthese. Gleichzeitig werfen die Befunde aber auch neue Fragen auf: i) Über welchen Mechanismus vermittelt die G99R Mutation die Aldosteronsekretion? ii) Ist das Src- und β -Catenin-Signaling aktiviert durch die ATP1A1-Mutationen? iii) Wie reguliert der pH_i die CYP11B2-Gentranskription und wie beeinflusst er die Funktion anderer Proteine des Aldosteronsynthesewegs?

Eine offene Frage bleibt auch weiterhin, ob APA-assoziierte Mutationen tatsächlich kausal für Adenomentstehung sind. Erste Indizien gab eine erst kürzlich veröffentlichte Studie, die zeigen konnte, dass Aldosteron-produzierende Zellcluster, die von der Zona glomerulosa bis in die fasciculata reichen, ebenfalls Mutationen in den APA-assoziierten „Hot-Spot-Genen“ aufwiesen. Es wird vermutet, dass solche Zellcluster sich im Laufe der Zeit zu Adenomen entwickeln (Nishimoto et al. 2015). Nachdem aber nicht alle Adenome Mutationen in den bekannten Genen tragen, ist es nicht auszuschließen, dass weitere Faktoren die Proliferation begünstigen. Ein aktiviertes Wnt/ β -Catenin-Signaling, wie es in etwa 2/3 der APAs gefunden wurde, wäre ein vorstellbarer Mechanismus (Berthon et al. 2014). Übermäßig aktiviertes WNT-Signaling wirkt proliferationsfördernd und spielt eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren (Behrens et al. 2004). Interessanterweise haben adrenokortikale Karzinome

gehäuft aktivierende Mutationen im CTNNB1-Gen (codierend für beta-Catenin (Tissier et al. 2005)). Da nur ein Bruchteil der analysierten APAs aktivierende Mutationen im CTNNB1-Gen trugen (Azizan et al. 2013; Scholl et al. 2013), liegt die Vermutung nahe, dass dieser Signalweg in den meisten Adenomen über nicht-genomische Mechanismen bzw. nicht durch Mutationen stimuliert wird.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abad-Cardiel M, Álvarez-Álvarez B, Luque-Fernandez L, Fernández C, Fernández-Cruz A, and Martell-Claros N. (2013). hypertension caused by primary hyperaldosteronism: increased heart damage and cardiovascular risk. *Rev. Española Cardiol. (English Version)*, 66, 47–52.
- Acelajado MC, Pimenta E, and Calhoun D. (2010). Salt and aldosterone: A concert of bad effects. *Hypertension*, 56, 804–805.
- Alnemri ES, Maksymowych a. B, Robertson NM, and Litwack G. (1991). Overexpression and characterization of the human mineralocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.*, 266, 18072–18081.
- Arakane F, King SR, Du Y, Kallen CB, Walsh LP, Watari H, Stocco DM, and Strauss JF. (1997). Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J. Biol. Chem.*, 272, 32656–32662.
- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, and Evans RM. (1987). Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*, 237, 268–275.
- August JT, Nelson DH, and Thorn GW. (1958). Response of normal subjects to large amounts of aldosterone. *J Clin Invest*, 1549–1555.
- Aunis D and Langley K. (1999). Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol. Scand.*, 167, 89–97.
- Azizan EA, Poulsen H, Tuluc P, Zhou J, Clausen M V, Lieb A, Maniero C, Garg S, Bochukova EG, Zhao W, Shaikh LH, Brighton CA, Teo AE, Davenport AP, Dekkers T, Tops B, Küsters B, Ceral J, Yeo GS, Neogi SG, McFarlane I, Rosenfeld N, Marass F, Hadfield J, Margas W, Chaggar K, Solar M, Deinum J, Dolphin AC, Farooqi IS, Striessnig J, Nissen P, and Brown MJ. (2013). Somatic mutations in ATP1A1 and CACNA1D underlie a common subtype of adrenal hypertension. *Nat. Genet.*, 45, 1055–1060.

- Barrett MH, Suzuki T, Sasano H, White PC, and Rainey WE. (2004). The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production. *Mol. Endocrinol.*, 18, 279–290.
- Barrett PQ, Bollag WB, Isaacs CM, McCarthy R, and Rasmussen H. (1989). Role of Calcium in angiotensin ii-mediated aldosterone secretion. *Endocr. Rev.*, 10, 496–518.
- Bassett MH, White P, and Rainey WE. (2004). The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 217, 67–74.
- Bassett MH, Zhang Y, Clyne CD, White PC, and Rainey WE. (2002). Differential regulation of aldosterone synthase and 11 β -hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. *J. Mol. Endocrinol.*, 28, 125–135.
- Behrens J and Lustig B. (2004). The Wnt connection to tumorigenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 48, 477–487.
- Benchetrit S, Bernheim J, and Podjarny E. (2002). Normokalemic hyperaldosteronism in patients with resistant hypertension. *Isr. Med. Assoc. J.*, 4, 17–20.
- Berthon A, Drelon C, Ragazzon B, Boulkroun S, Tissier F, Amar L, Samson-Couterie B, Zennaro MC, Plouin PF, Skah S, Plateroti M, Lefèbvre H, Sahut-Barnola I, Batisse-Lignier M, Assié G, Martinez AM, Bertherat J, Martinez A, and Val P. (2014). WNT/ β -catenin signalling is activated in aldosteroneproducing adenomas and controls aldosterone production. *Hum. Mol. Genet.*, 23, 889–905.
- Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Joussineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, Taketo MM, Tissier F, Bertherat J, Lefrançois-Martinez A-M, Martinez A, and Val P. (2010). Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum. Mol. Genet.*, 19, 1561–1576.
- Beuschlein F, Boulkroun S, Osswald A, Wieland T, Nielsen HN, Lichtenauer UD, Penton D, Schack VR, Amar L, Fischer E, Walther A, Tauber P, Schwarzmayer T, Diener S, Graf E, Allolio B, Samson-Couterie B, Benecke AG, Quinkler M, Fallo F, Plouin PF, Mantero F, Meitinger T, Mulatero P, Jeunemaitre X, Warth R, Vilsen B, Zennaro MC, Strom TM, 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.
- Bhargava A, Fullerton MJ, Myles K, Purdy TM, Funder JW, Pearce D, and Cole TJ. (2001). The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology*, 142, 1587–1594.
- Bird IM, Hanley NA, Word RA, Mathis JM, McCarthy JL, Mason JI, and Rainey WE. (1993). Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion. *Endocrinology*, 133, 1555–61.
- Blumenfeld JD, Sealey JE, Schluskel Y, Vaughan ED, Sos TA, Atlas SA, Muller FB, Acevedo R, Ulick S, and Laragh JH. (1994). diagnosis and treatment of primary hyperaldosteronism. *Ann. Intern. Med.*, 121, 877–885.

- Boczek T, Lisek M, Ferenc B, Kowalski A, Stepinski D, Wiktorska M, and Zylinska L. (2014). Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoforms composition regulates cellular pH homeostasis in differentiating PC12 cells in a manner dependent on cytosolic Ca^{2+} elevations. *PLoS One*, 9, e102352.
- Bollag WB, Barrett PQ, Isales CM, Liscovitch M, and Rasmussen H. (1990). A potential role for phospholipase-d in the angiotensin-ii-induced stimulation of aldosterone secretion from bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology*, 127, 1436–1443.
- Bollag WB, Jung E, and Calle RA. (2002). Mechanism of angiotensin II-induced phospholipase D activation in bovine adrenal glomerulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 192, 7–16.
- Boulkroun S, Samson-Couterie B, Golib-Dzib J-F, Amar L, Plouin P-F, Sibony M, Lefèbvre H, Louiset E, Jeunemaitre X, Meatchi T, Benecke AG, Lalli E, and Zennaro MC. (2011). Aldosterone-Producing Adenoma formation in the adrenal cortex involves expression of stem/progenitor cell markers. *Endocrinology*, 152, 4753–4763.
- Brauneis U, Vassilev PM, Quinn SJ, Williams GH, and Tillotson DL. (1991). ANG II blocks potassium currents in zona glomerulosa cells from rat, bovine, and human adrenals. *Am. J. Physiol.*, 260, E772–E779.
- Brenner T and O'Shaughnessy KM. (2008). Both TASK-3 and TREK-1 two-pore loop K channels are expressed in H295R cells and modulate their membrane potential and aldosterone secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 295, E1480–E1486.
- Bromfield S. (2014). High blood pressure: the leading global burden of disease risk factor and the need for worldwide prevention programs. *Curr Hypertens Rep*, 15, 134–136.
- Brose N and Rosenmund C. (2002). Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J. Cell Sci.*, 115, 4399–4411.
- Burnay MM, Python CP, Vallotton MB, Capponi AM, and Rossier MF. (1994). Role of the capacitative calcium influx in the activation of steroidogenesis by angiotensin-II in adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology*, 135, 751–758.
- Capponi AM. (2002). Regulation of cholesterol supply for mineralocorticoid biosynthesis. *Trends Endocrinol. Metab.*, 13, 118–121.
- Carey RM, Ayers CR, and Darracott Vaughan E. (1979). Activity of [des-aspartyl1]-angiotensin II in primary aldosteronism. *J. Clin. Invest.*, 63, 718–726.
- Chen XL, Bayliss DA, Fern RJ, and Barrett PQ. (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–F683.
- Chen Y, Cai T, Yang C, Turner DA, Giovannucci DR, and Xie Z. (2008). Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated calcium release by the Na/K-ATPase in cultured renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 283, 1128–36.

- Cheng CJ, Sung CC, Wu ST, Lin YC, Sytwu HK, Huang CL, and Lin SH. (2014). Novel KCNJ5 mutations in sporadic aldosterone-producing adenoma reduce Kir3.4 membrane abundance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 100, E155–E163.
- Cherniavsky-Lev M, Golani O, Karlsh SJD, and Garty H. (2014). Ouabain-induced internalization and lysosomal degradation of the Na⁺/K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.*, 289, 1049–59.
- Cherradi N, Brandenburger Y, and Capponi AM. (1998). Mitochondrial regulation of mineralocorticoid biosynthesis by calcium and the StAR protein. *Eur. J. Endocrinol.*, 139, 249–56.
- Cho JH, Musch MW, Bookstein CM, McSwine RL, Rabenau K, and Chang EB. (1998). Aldosterone stimulates intestinal Na⁺ absorption in rats by increasing NHE3 expression of the proximal colon. *Am. J. Physiol.*, 274, C586–C594.
- Choi M, Scholl UI, Yue P, Björklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, Ji W, Cho Y, Patel A, Men CJ, Lolis E, Wisgerhof M V, Geller DS, Mane S, Hellman P, Westin G, Åkerström G, Wang W, Carling T, and Lifton RP. (2011). K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science*, 331, 768–72.
- Chorvatova A, Guyot A, Ojeda C, Rougier O, and Bilbaut A. (1998). Activation by angiotensin II of Ca²⁺-dependent K⁺ and Cl⁻ currents in zona fasciculata cells of bovine adrenal gland. *J. Membr. Biol.*, 162, 39–50.
- Christ M, Meyer C, Sippel K, and Wehling M. (1995). Rapid aldosterone signaling in vascular smooth muscle cells: involvement of phospholipase C, diacylglycerol and protein kinase C alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 213, 123–129.
- Clyne CD, Zhang Y, Slutsker L, Mathis JM, White PC, and Rainey WE. (1997). Angiotensin II and potassium regulate human CYP11B2 transcription through common cis-elements. *Mol. Endocrinol.*, 11, 638–649.
- Cohen CJ, McCarthy RT, Barrett PQ, and Rasmussen H. (1988). Ca channels in adrenal glomerulosa cells: K⁺ and angiotensin II increase T-type Ca channel current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85, 2412–2416.
- Collins KJ, Foster KG, and Hubbard JL. (1970). Effect of aldosterone on mammalian eccrine sweat glands. *Experientia*, 26, 1313–1314.
- Condon JC, Pezzi V, Drummond BM, Yin S, and Rainey WE. (2002). Calmodulin-dependent kinase I regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase. *Endocrinology*, 143, 3651–3657.
- Conlin PR, Canessa ML, and Williams H. (1993). Calcium-mediated intracellular acidification and activation of Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange in adrenal glomerulosa cells stimulated with potassium. *Endocrinology*, 123, 1345–52.
- Conn JW and Louis LH. (1956). Primary aldosteronism, a new clinical entity. *Ann. Intern. Med.*, 44, 1–15.

- Connell JM and Davies E. (2005). The new biology of aldosterone. *J. Endocrinol.*, 186, 1–20.
- Cooper MJ, Hutchins GM, and Israel MA. (1990). Histogenesis of the human adrenal medulla. An evaluation of the ontogeny of chromaffin and nonchromaffin lineages. *Am. J. Pathol.*, 137, 605–615.
- Czirják G and Enyedi P. (2002). TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol. Endocrinol.*, 16, 621–629.
- Dekkers T, ter Meer M, Lenders JW, Hermus AR, Schultze Kool L, Langenhuijsen JF, Nishimoto K, Ogishima T, Mukai K, Azizan EA, Tops B, Deinum J, and Küsters B. (2014). Adrenal nodularity and somatic mutations in primary aldosteronism: one node is the culprit? *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 99, E772–E779.
- Denner K, Rainey WE, Pezzib V, Birdb IM, Bernhardt R, and Mathis JM. (1996). Differential regulation of 11 β -hydroxylase and aldosterone synthase in human adrenocortical H295R cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 120, 87–91.
- Douma S, Petidis K, Doulas M, Papaefthimiou P, Triantafyllou A, Kartali N, Papadopoulos N, Vogiatzis K, and Zamboulis C. (2008). Prevalence of primary hyperaldosteronism in resistant hypertension: a retrospective observational study. *Lancet*, 371, 1921–6.
- Eakle KA, Kabalin MA, Wang SG, and Farley RA. (1994). The influence of b-subunit structure on the stability of Na⁺/K⁺-ATPase complexes and interaction with K. *J. Biol. Chem.*, 269, 6550–6557.
- Edwards CR, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre M a, Sutanto WS, de Kloet ER, and Monder C. (1988). Localisation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet*, 2, 986–989.
- Einholt AP, Andersen JP, and Vilsen B. (2007). Importance of Leu99 in transmembrane segment M1 of the Na⁺, K⁺-ATPase in the binding and occlusion of K⁺. *J. Biol. Chem.*, 282, 23854–66.
- Ely JA, Ambroz C, Baukal AJ, Christensen SB, Balla T, and Catt KJ. (1991). Relationship between agonist- and thapsigargin-sensitive calcium pools in adrenal glomerulosa cells: Thapsigargin-induced Ca²⁺ mobilization and entry. *J. Biol. Chem.*, 266, 18635–18641.
- Fedorova O and Bagrov A. (1997). Inhibition of Na/K ATPase from rat aorta by two Na/K pump inhibitors, ouabain and marinobufagenin: evidence of interaction with different alpha-subunit isoforms. *Am. J. Hypertens.*, 10, 929–935.
- Fejes-Tóth G, Pearce D, and Náray-Fejes-Tóth 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.
- Feldman RD and Gros R. (2013). Vascular effects of aldosterone: Sorting out the receptors and the ligands. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 40, 916–921.

- Fernandes-Rosa FL, Williams TA, Riester A, Steichen O, Beuschlein F, Boulkroun S, Strom TM, Monticone S, Amar L, Meatchi T, Mantero F, Cicala M-V, Quinkler M, Fallo F, Allolio B, Bernini G, Maccario M, Giacchetti G, Jeunemaitre X, Mulatero P, Reincke M, and Zennaro MC. (2014). Genetic spectrum and clinical correlates of somatic mutations in aldosterone-producing adenoma. *Hypertens.*, 64, 354–361.
- Feron O and Godfraind T. (1995). Regulation of the L-type calcium channel α -1 subunit by chronic depolarization in the neuron-like PC12 and aortic smooth muscle A7r5 cell lines. *Pflügers Arch.*, 430, 323–332.
- Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M, and Lazdunski M. (1998). A neuronal two P domain K^+ channel activated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acid. *Embo J.*, 17, 3297–3308.
- Flores SY, Loffing-Cueni D, Kamynina E, Daidié D, Gerbex C, Chabanel S, Dudler J, Loffing J, and Staub O. (2005). Aldosterone-induced serum and glucocorticoid-induced kinase 1 expression is accompanied by Nedd4-2 phosphorylation and increased Na^+ transport in cortical collecting duct cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16, 2279–2287.
- Funder JW, Pearce PT, Smith R, and Smith a I. (1988). Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science*, 242, 583–585.
- Gadsby D, Kimura J, and Noma A. (1985). Voltage dependence of Na/K pump current in isolated heart cells. *Nature*, 315, 63–5.
- Ganguly A. (1998). Primary Aldosteronism. *N. Engl. J. Med.*, 339, 1828–1834.
- Ganguly A and Davis JS. (1994). Role of calcium and other mediators in aldosterone secretion from the adrenal glomerulosa cells. *Pharmacol. Rev.*, 46, 417–447.
- Geerling JC, Engeland WC, Kawata M, and Loewy AD. (2006). Aldosterone target neurons in the nucleus tractus solitarius drive sodium appetite. *J. Neurosci.*, 26, 411–417.
- Gekle M, Golenhofen N, Oberleithner H, and Silbernagl S. (1996). Rapid activation of Na^+/H^+ exchange by aldosterone in renal epithelial cells requires Ca^{2+} and stimulation of a plasma membrane proton conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 10500–10504.
- Gekle M and Grossmann C. (2009). Actions of aldosterone in the cardiovascular system: The good, the bad, and the ugly? *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, 458, 231–246.
- Geller DS, Zhang J, Wisgerhof MV, Shackleton C, Kashgarian M, and Lifton RP. (2008). A Novel Form of Human Mendelian Hypertension Featuring Nonglucocorticoid-Remediable Aldosteronism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93, 3117–3123.
- Gonzalez-Campoy JM, Romero JC, and Knox FG. (1989). Escape from the sodium-retaining effects of mineralocorticoids: role of ANF and intrarenal hormone systems. *Kidney Int.*, 35, 767–777.

- Gottardo F, Cesari M, Morra A, Gardiman M, Fedier A, and Dal Bianco M. (2010). A kidney tumor in an adolescent with severe hypertension and hypokalemia: an uncommon case – case report and review of the literature on reninoma. *Urol. Int.*, 85, 121–124.
- Gray, Henry. *Anatomy of the Human Body*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1918; Bartleby.com, 2000. www.bartleby.com/107/.
- Gu J, Wen Y, Mison A, and Nadler JL. (2003). 12-lipoxygenase pathway increases aldosterone production, 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein phosphorylation, and p38 mitogen-activated protein kinase activation in H295R human adrenocortical cells. *Endocrinology*, 144, 534–543.
- Guagliardo N, Yao J, Hu C, and Barrett PQ. (2012). Minireview: Aldosterone biosynthesis: electrically gated for our protection. *Endocrinology*, 153, 3579–3586.
- Guichard JL, Clark D, Calhoun DA, and Ahmed MI. (2013). Aldosterone receptor antagonists: Current perspectives and therapies. *Vasc. Health Risk Manag.*, 9, 321–331.
- Haas M, Wang H, Tian J, and Xie Z. (2002). Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na⁺/K⁺-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, 277, 18694–18702.
- Hajnoczky G, Hunyady L, Csordas G, Balla T, Enyedi P, and Spät A. (1992). Angiotensin-II inhibits Na⁺/K⁺ pump in rat adrenal glomerulosa cells: possible contribution to stimulation of aldosterone production. *Endocrinology*, 130, 1637–1644.
- Hall JE, Granger JP, Hester RL, Coleman TG, Smith MJ, and Cross RB. (1984). Mechanisms of escape from sodium retention during angiotensin II hypertension. *Am. J. Physiol.*, 246, F627–F634.
- Harvey BJ and Higgins M. (2000). Nongenomic effects of aldosterone on Ca²⁺ in M-1 cortical collecting duct cells. *Kidney Int.*, 57, 1395–1403.
- Harwood S and Yaqoob MM. (2005). Ouabain-induced cell signaling. *Front. Biosci.*, 2011–2017.
- Haserath K, Gerdes D, Berger S, Feuring M, Günther a, Herbst C, Christ M, and Wehling M. (1999). Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266, 257–261.
- Hattangady NG, Olala LO, Bollag WB, and Rainey WE. (2012). Acute and chronic regulation of aldosterone production. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 350, 151–62.
- Hiramatsu K, Yamada T, Yukimura Y, Komiya I, Ichikawa K, Ishihara M, Nagata H, and Izumiyama T. (1981). A screening test to identify aldosterone-producing adenoma by measuring plasma renin activity: Results in hypertensive patients. *Arch. Intern. Med.*, 141, 1589–1593.

- Hirasawa G, Sasano H, and Nagura H. (1997). Colocalization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human epithelia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82, 21–25.
- Huang BS, White RA, Ahmad M, Jeng AY, and Leenen FHH. (2008). Central infusion of aldosterone synthase inhibitor prevents sympathetic hyperactivity and hypertension by central Na(+) in Wistar rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 295, R166–R172.
- Hunyady L, Bàuakal AJ, Bor M, Ely JA, and Catt KJ. (1990). Regulation of 1,2-diacylglycerol production by angiotensin-II in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology*, 126, 1001–1008.
- Iida S and Potter JD. (1986). Calcium binding to calmodulin. Cooperativity of the calcium-binding sites. *J. Biochem.*, 99, 1765–1772.
- Kaplan JH. (2002). Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.*, 71, 511–35.
- Karni R, Gus Y, Dor Y, Meyuhas O, and Levitzki A. (2005). Active src elevates the expression of β -catenin by enhancement of cap-dependent translation active src elevates the expression of beta-catenin by enhancement of cap-dependent translation. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 5031–5039.
- Kayes-Wandover KM and White PC. (2000). Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 2519–2525.
- Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Whelton PK, and He J. (2004). Worldwide prevalence of hypertension : a systematic review. *J. Hypertens.*, 22, 11–19.
- Kojima I, Kojima K, and Rasmussen H. (1985). Role of calcium fluxes in the sustained phase of angiotensin II- mediated aldosterone secretion from adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.*, 260, 9177–9184.
- Kopec W, Loubet B, Poulsen H, and Khandelia H. (2014). Molecular mechanism of Na⁺,K⁺-ATPase malfunction in mutations characteristic of adrenal hypertension. *Biochemistry*, 53, 746–754.
- Kramer RE, Robinson TV, Schneider EG, and Smith TG. (2000). Direct modulation of basal and angiotensin II-stimulated aldosterone secretion by hydrogen ions. *J. Endocrinol.*, 166, 183–194.
- Kuppusamy M, Caroccia B, Stindl J, Bandulik S, Lenzini L, Gioco F, Fishman V, Zanotti G, Gomez-Sanchez CE, Bader M, Warth R, and Rossi GP. (2014). A novel KCNJ5-insT149 somatic mutation close to, but outside, the selectivity filter causes resistant hypertension by loss of selectivity for potassium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, jc20141927.
- Lai F, Madan N, Ye Q, Duan Q, Li Z, Wang S, Si S, and Xie Z. (2013). Identification of a mutant $\alpha 1$ Na/K-ATPase that pumps but is defective in signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 288, 13295–304.

- Lambeth JD, Seybert DW, Lancaster JR, Salerno JC, and Kamin H. (1982). Steroidogenic electron transport in adrenal cortex mitochondria. *Mol. Cell. Biochem.*, 2, 13–31.
- Lenzini L, Caroccia B, Campos AG, Fassina A, Belloni AS, Seccia TM, Kuppusamy M, Ferraro S, Skander G, Bader M, Rainey WE, and Rossi GP. (2014). Lower expression of the TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel 2 (TASK-2) gene is a hallmark of aldosterone-producing adenoma causing human primary aldosteronism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 99, 674–682.
- Li Z, Cai T, Tian J, Xie JX, Zhao X, Liu L, Shapiro JI, and Xie Z. (2009). NAKtide, a Na/K-ATPase-derived peptide Src inhibitor, antagonizes Ouabain-activated signal transduction in cultured cells. *J. Biol. Chem.*, 284, 21066–21076.
- Lieberman S and Lin YY. (2001). Reflections on sterol sidechain cleavage process catalyzed by cytochrome P450_{scc}. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 78, 1–14.
- Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, and Lalouel JM. (1992). A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature*, 355, 262–265.
- Lin D, Sugawara T, Strauss JF, Clark B, Stocco DM, Saenger P, Rogol a, and Miller WL. (1995). Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science*, 267, 1828–1831.
- Ling GN and Palmer LG. (1972). Studies on ion permeability: The mechanism of ouabain action on the Na⁺-ion efflux in frog muscles. *Physiol. Chem. Ans Phys.*, 4, 517–525.
- Liu J, Tian J, Haas M, Shapiro JI, Askari A, and Xie Z. (2000). Ouabain interaction with cardiac Na⁺/K⁺-atpase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations. *J. Biol. Chem.*, 275, 27838–44.
- Lombès M, Binart N, Delahaye F, Baulieu EE, and Rafestin-Oblin ME. (1994). Differential intracellular localization of human mineralocorticosteroid receptor on binding of agonists and antagonists. *Biochem. J.*, 302, 191–197.
- Lotshaw DP. (1997). Characterization of Angiotensin II-regulated K⁺ conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *J. Membr. Biol.*, 277, 261–277.
- Lotshaw DP. (2001). Role of membrane depolarization and T-type Ca²⁺ channels in angiotensin II and K⁺ stimulated aldosterone secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 175, 157–171.
- Lotshaw DP. (2006). Biophysical and pharmacological characteristics of native two-pore domain TASK channels in rat adrenal glomerulosa cells. *J. Membr. Biol.*, 210, 51–70.
- Lu L, Suzuki T, Yoshikawa Y, Murakami O, Miki Y, Moriya T, Bassett MH, Rainey WE, Hayashi Y, and Sasano H. (2004). Nur-related factor 1 and nerve growth factor-induced clone B in human adrenal cortex and its disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89, 4113–4118.

- Malsure S, Wang Q, Charles RP, Sergi C, Perrier R, Christensen BM, Maillard M, Rossier BC, and Hummler E. (2014). colon-specific deletion of epithelial sodium channel causes sodium loss and aldosterone resistance. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1–12.
- Manna PR, Eubank DW, Lalli E, Sassone-Corsi P, and Stocco DM. (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.
- Marney AM and Brown NJ. (2007). Aldosterone and end-organ damage. *Clin. Sci.*, 113, 267.
- Mason JI and Rainey WE. (1987). Steroidogenesis in the human fetal adrenal: A role for cholesterol synthesis de novo. *J Clin Endo Meta*, 64, 140–147.
- Matsunaga H, Yamashita N, Maruyama Y, Kojima I, and Kurokawa K. (1987). Evidence for two distinct voltage-gated calcium channel currents in bovine adrenal glomerulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149, 1049–1054.
- Matthews EK and Saffran M. (1973). Ionic dependence of adrenal steroidogenesis and ACTH-induced changes in the membrane potential of adrenocortical cells. *J. Physiol.*, 43–64.
- McEwen BS, de Kloet ER, and Rostene W. (1986). Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol. Rev.*, 66, 1121–1188.
- Michea L, Delpiano AM, Hitschfeld C, Lobos L, Lavandero S, and Marusic ET. (2005). Eplerenone blocks nongenomic effects of aldosterone on the Na⁺/H⁺ exchanger, intracellular Ca²⁺ levels, and vasoconstriction in mesenteric resistance vessels. *Endocrinology*, 146, 973–980.
- Miller WL. (2008). Steroidogenic enzymes. *Endocr. Dev.*, 13, 1–18.
- Montani JP and van Vliet BN . (2004). General Physiology and Pathophysiology of the Renin – Angiotensin System. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 163, 3–29.
- Monticone S, Castellano I, Versace K, Lucatello B, Veglio F, Gomez-Sanchez CE, Williams TA, and Mulatero P. (2015). Immunohistochemical, genetic and clinical characterization of sporadic aldosterone-producing adenomas. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 411, 146–154.
- Monticone S, Hattangady NG, Penton D, Isales CM, Edwards MA, Williams TA, Sterner C, Warth R, Mulatero P, and Rainey WE. (2013). a Novel Y152C KCNJ5 mutation responsible for familial hyperaldosteronism type III. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 98, E1861–5.
- Mulatero P, Monticone S, Bertello C, Viola A, Tizzani D, Iannaccone A, Crudo V, Burrello J, Milan A, Rabbia F, and Veglio F. (2013). long-term cardio- and cerebrovascular events in patients with primary aldosteronism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 98, 4826–4833.

- Mulatero P, Monticone S, Rainey WE, Veglio F, and Williams TA. (2013). Role of KCNJ5 in familial and sporadic primary aldosteronism. *Nat Rev Endocrinol*, 9, 104–112.
- Natarajan R, Stern N, Hsueh W, Do Y, and Nadler JL. (1988). Role of the lipoxygenase pathway in angiotensin II-mediated aldosterone biosynthesis in human adrenal glomerulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 67, 584–591.
- Natke E and Kabela E. (1979). Electrical responses in cat adrenal cortex: possible relation to aldosterone secretion. *Am. J. Physiol.*, 237, E158–E162.
- Nishimoto K, Tomlins SA, Kuick R, Cani AK, Giordano TJ, Hovelson DH, Liu CJ, Sanjanwala AR, Edwards MA, Gomez-Sanchez CE, Nanba K, and Rainey WE. (2015). Aldosterone-stimulating somatic gene mutations are common in normal adrenal glands. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, E4591–9.
- Nishimura M, Uzu T, Fujii T, Kuroda S, Nakamura S, Inenaga T, and Kimura G. (1999). Cardiovascular complications in patients with primary aldosteronism. *Am. J. Kidney Dis.*, 33, 261–266.
- Nogueira EF and Rainey WE. (2010). Regulation of aldosterone synthase by activator transcription factor/cAMP response element-binding protein family members. *Endocrinology*, 151, 1060–1070.
- Nogueira EF, Xing Y, Morris CA, and Rainey WE. (2009). Role of angiotensin II-induced rapid response genes in the regulation of enzymes needed for aldosterone synthesis. *J. Mol. Endocrinol.*, 42, 319–330.
- Nyblom M, Poulsen H, Gourdon P, Reinhard L, Andersson M, Lindahl E, Fedosova N, and Nissen P. (2013). Crystal structure of Na⁺, K⁺-ATPase in the Na⁺-bound state. *Science*, 342, 123–7.
- Ogawa H, Shinoda T, Cornelius F, and Toyoshima C. (2009). Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106, 13742–7.
- Ogawa H and Toyoshima C. (2002). Homology modeling of the cation binding sites of Na⁺/K⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99, 15977–15982.
- Oki K, Plonczynski MW, Lam ML, Gomez-Sanchez EP, and Gomez-Sanchez CE. (2012). Potassium channel mutant KCNJ5 T158A expression in HAC-15 cells increases aldosterone synthesis. *Endocrinology*, 153, 1774–1782.
- Ouyang J, Hu D, Wang B, Shi T, Ma X, Li H, Wang S, and Zhang X. (2011). Differential effects of down-regulated steroidogenic factor-1 on basal and angiotensin II-induced aldosterone secretion. *J. Endocrinol. Invest.*, 671–675.
- Paul M, Mehr AP, and Kreutz R. (2006). Physiology of local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol. Rev.*, 86, 747–803.
- Payet MD, Gallo-Payet N, and Guillon G. (1994). Characterization of K⁺ and Ca²⁺ ionic currents in glomerulosa cells from human adrenal glands. *Endocrinology*, 134, 2589–2598.

- Payne AH and Hales DB. (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr. Rev.*, 25, 947–70.
- Pelletier G, Li S, Luu-The V, Tremblay Y, Bélanger a., and Labrie F. (2001). Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450scc, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450c17) in rat adrenal cortex and gonads. *J. Endocrinol.*, 171, 373–383.
- Penton D. (2011). The role of Task3 potassium channels in the regulation of aldosterone secretion in the adrenal gland. *Dr. Thesis, Univ. Regensburg*. Retrieved from urn:nbn:de:bvb:355-epub-216660
- Pezzi V, Clyne CD, Ando S, Mathis JM, and Rainey WE. (1997). Ca²⁺-regulated expression of aldosterone synthase is mediated by calmodulin and calmodulin-dependent protein kinases. *Endocrinology*, 138, 835–838.
- Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29, 2002–2007.
- Piaditis G, Markou A, Papanastasiou L, Androulakis II, and Kaltsas G. (2015). Progress in aldosteronism: a review of the prevalence of primary aldosteronism in pre-hypertension and hypertension. *Eur. J. Endocrinol.*, 172, R191–R203.
- Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, and Gatlín M. (2003). Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.*, 348, 2373–2383.
- Pitt B, Zannad F, Remme W, Cody R, Castaigne A, Perez A, Jolie P, and Wittes J. (1999). The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N. Engl. J. Med.*, 341, 709–717.
- Post R, Hegyvary C, and Kume S. (1972). Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 247, 6530–6540.
- Pralong WF, Hunyady L, Várnai P, Wollheim CB, and Spät 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.
- Quinn SJ, Cornwall MC, and Williams GH. (1987). Electrophysiological responses to angiotensin II of isolated rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology*, 120, 1581–9.
- Ribstein J, Du Cailar G, Fesler P, and Mimran A. (2005). Relative glomerular hyperfiltration in primary aldosteronism. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16, 1320–1325.
- Robinson RL, Culbertson JL, and Carmichael SW. (1983). Influence of hypothalamic stimulation on the secretion of adrenal medullary catecholamines. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 8, 89–96.
- Rocha R and Stier CT. (2001). Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues. *Trends Endocrinol. Metab.*, 12, 308–314.

- Rocha R, Stier CT, Kifor I, Ochoa-Maya MR, Rennke HG, Williams GH, and Adler GK. (2000). Aldosterone: A mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology*, 141, 3871–3878.
- Rogerson FM, Brennan FE, and Fuller PJ. (2004). Mineralocorticoid receptor binding, structure and function. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 217, 203–212.
- Rohács T, Bagó A, Deák F, Hunyady L, and Spät A. (1994). Capacitative Ca^{2+} influx in adrenal glomerulosa cells: possible role in angiotensin II response. *Am. J. Physiol.*, 267, C1246–C1252.
- Rolfe DF and Brown GC. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.*, 77, 731–758.
- Romero DG, Gomez-Sanchez EP, and Gomez-Sanchez CE. (2010). Angiotensin II-regulated transcription regulatory genes in adrenal steroidogenesis. *Physiol. Genomics*, 42A, 259–266.
- Rossi GP, Boscaro M, Ronconi V, and Funder JW. (2005). Aldosterone as a cardiovascular risk factor. *Trends Endocrinol. Metab.*, 16, 104–107.
- Rossier MF, Burnay MM, Vallotton MB, and Capponi AM. (1996). Distinct functions of T- and L-type calcium channels during activation of bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology*, 137, 4817–4826.
- Sánchez G, and Blanco G (2004). Residues within transmembrane domains 4 and 6 of the Na,K-ATPase alpha subunit are important for Na^{+} selectivity. *Biochemistry*, 43, 9061–74.
- Sakai RR, Ma LY, Zhang DM, McEwen BS, and Fluharty SJ. (1996). Intracerebral administration of mineralocorticoid receptor antisense oligonucleotides attenuate adrenal steroid-induced salt appetite in rats. *Neuroendocrinology*, 64, 425–429.
- Schirpenbach C, Segmiller F, Diederich S, Hahner S, Lorenz R, Rump LC, Seufert J, Quinkler M, Bidlingmaier M, Beuschlein F, Endres S, and Reincke M. (2009). The diagnosis and treatment of primary hyperaldosteronism in Germany: results on 555 patients from the German Conn Registry. *Dtsch. Arztebl. Int.*, 106, 305–311.
- Schneider S, Yano Y, Sumpio B, Jena B, Geibel J, Gekle M, and Oberleithner H. (1997). Rapid aldosterone-induced cell volume increase of endothelial cells measured by the atomic force microscope. *Cell Biol Int*, 21, 759–68.
- Scholl UI, Goh G, Stölting G, de Oliveira RC, Choi M, Overton JD, Fonseca AL, Korah R, Starker LF, Kuntsman JW, Prasad ML, Hartung EA, Mauras N, Benson MR, Brady T, Shapiro JR, Loring E, Nelson-Williams C, Libutti SK, Mane S, Hellman P, Westin G, Åkerström G, Björklund P, Carling T, Fahlke C, Hidalgo P, and Lifton RP. (2013). Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. *Nat. Genet.*, 45, 1050–4.
- Scholl UI, Nelson-Williams C, Yue P, Grekin R, Wyatt RJ, Dillon MJ, Couch R, Hammer LK, Harley FL, Farhi A, Wang WH, and Lifton RP. (2012). Hypertension with or

- without adrenal hyperplasia due to different inherited mutations in the potassium channel KCNJ5. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109, 2533–2538.
- Schwartz A, Whitmer K, Grupp G, Grupp I, Adams RJ, and Lee SW. (1982). Mechanism of action of digitalis: is the Na,K-ATPase the pharmacological receptor? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 402, 253–271.
- Seiler L and Reincke M. (2003). Der Aldosteron-Renin-Quotient bei sekundärer Hypertonie. *Herz*, 28, 686–691.
- Shah JR, Laredo J, Hamilton BP, and Hamlyn JM. (1999). Effects of angiotensin II on sodium potassium pumps, endogenous ouabain, and aldosterone in bovine zona glomerulosa cells. *Hypertension*, 33, 373–377.
- Shinoda T, Ogawa H, Cornelius F, and Toyoshima C. (2009). Crystal structure of the sodium - potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature*, 459, 446–450.
- Sirianni R, Carr BR, Pezzi V, and Rainey WE. (2001). A role for src tyrosine kinase in regulating adrenal aldosterone production. *J. Mol. Endocrinol.*, 26, 207–15.
- So A, Duffy DL, Gordon RD, Jeske YW, Lin-Su K, New MI, 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.
- Spät A. (1988). Stimulus-secretion coupling in angiotensin-stimulated adrenal glomerulosa cells. *J. Biochem.*, 29, 443–453.
- Spät A and Hunyady L. (2004). Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev*, 84, 489–539.
- Stier CT, Rocha R, and Chander PN. (2005). Effect of aldosterone and MR blockade on the brain and the kidney. *Heart Fail. Rev.*, 10, 53–62.
- Stocco DM, Wang X, Jo Y, and Manna PR. (2005). Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol. Endocrinol.*, 19, 2647–2659.
- Stockand JD. (2002). New ideas about aldosterone signaling in epithelia. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 282, F559–F576.
- Stowasser M and Gordon RD. (2004). Primary aldosteronism - Careful investigation is essential and rewarding. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 217, 33–39.
- Stowasser M, Taylor PJ, Pimenta E, Ahmed AH, and Gordon RD. (2010). Laboratory investigation of primary aldosteronism. *Clin. Biochem. Rev.*, 31, 39–56.
- Strack AM, Sawyer WB, Platt KB, and Loewy AD. (1989). CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labeling with pseudorabies virus. *Brain Res.*, 491, 274–296.
- Sucheston ME and Cannon MS. (1968). Development of zonular patterns in the human adrenal gland. *J. Morphol.*, 126, 477–491.

- Sukor N, Mulatero P, Gordon RD, 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.
- Summa V, Mordasini D, Roger F, Bens M, Martin PY, Vandewalle A, Verrey F, and Féraille E. (2001). Short term effect of aldosterone on Na,K-ATPase cell surface expression in kidney collecting duct cells. *J. Biol. Chem.*, 276, 47087–47093.
- Takeda Y, Miyamori I, Inaba S, Furukawa K, Hatakeyama H, Yoneda T, Mabuchi H, and Takeda R. (1997). Vascular Aldosterone in Genetically Hypertensive Rats. *Hypertens.*, 29, 45–48.
- Tannock IF, and Rotin D. (1989). Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation perspectives in cancer research acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res.*, 49, 4373–4384.
- Tauber P, Penton D, Stindl J, Humberg E, Tegtmeier I, Sterner C, Beuschlein F, Reincke M, Barhanin J, Bandulik S, and Warth R. (2014). Pharmacology and pathophysiology of mutated KCNJ5 found in adrenal aldosterone-producing adenomas. *Endocrinology*, 155, 1353–1362.
- Thomas RC. (2009). The plasma membrane calcium ATPase (PMCA) of neurones is electroneutral and exchanges 2 H⁺ for each Ca²⁺ or Ba²⁺ ion extruded. *J. Physiol.*, 587, 315–327.
- Thomas W and Harvey BJ. (2011). Mechanisms underlying rapid aldosterone effects in the kidney. *Annu. Rev. Physiol.*, 73, 335–357.
- Tian J, Cai T, Yuan Z, Wang H, Liu L, Haas M, Maksimova E, Huang XY, and Xie ZJ. (2006). Binding of Src to Na⁺/K⁺-ATPase forms a functional signaling complex. *Molecular Biol. Cell*, 17, 317–326.
- Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagneré AM, René-Corail F, Jullian E, Gicquel C, Bertagna X, Vacher-Lavenu MC, Perret C, and Bertherat J. (2005). Mutations of β -catenin in adrenocortical tumors: Activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res.*, 65, 7622–7627.
- Tomaschitz A, Pilz S, Ritz E, Meinitzer A, Boehm BO, and März W. (2010). Plasma aldosterone levels are associated with increased cardiovascular mortality: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Eur. Heart J.*, 31, 1237–1247.
- Tombaugh GC and Somjen GG. (1997). Differential sensitivity to intracellular pH among high- and low-threshold Ca²⁺ currents in isolated rat CA1 neurons. *J. Neurophysiol.*, 77, 639–653.
- 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.

- Tytgat J, Nilius B, and Carmeliet E. (1990). Modulation of the T-type cardiac Ca channel by changes in proton concentration. *J. Gen. Physiol.*, 96, 973–990.
- Unger T and Li J. (2004). The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, 7–10.
- Van der Bent V, Demole C, Johnson E, Rossier MF, Python CP, Vallotton B, and Capponi AM. (2014). Sodium in the activation of aldosterone. *Endocrinology*, 133, 1213–1220.
- 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.
- Wald H, Garty H, Palmer LG, and Popovtzer MM. (1998). Differential regulation of ROMK expression in kidney cortex and medulla by aldosterone and potassium. *Am. J. Physiol.*, 275, F239–F245.
- Wehling M, Kasmayr J, and Theisen K. (1990). Aldosterone influences free intracellular calcium in human mononuclear leukocytes in vitro. *Cell Calcium*, 11, 565–571.
- Wehling M and Lösel R. (2006). Non-genomic steroid hormone effects: Membrane or intracellular receptors? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 102, 180–183.
- Wehling M, Ulsenheimer A, Schneider M, Neylon C, and Christ M. (1994). Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 204, 475–481.
- Wilke BU, Lindner M, Greifenberg L, Albus A, Kronimus Y, Bünemann M, Leitner MG, and Oliver D. (2014). Diacylglycerol mediates regulation of TASK potassium channels by Gq-coupled receptors. *Nat Commun*, 5, 5540.
- Williams TA, Monticone S, Schack VR, 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. (2014). Somatic ATP1A1, ATP2B3, and KCNJ5 mutations in aldosterone-producing adenomas. *Hypertension*, 63, 188–195.
- Wu V, Yang SY, Lin JW, Cheng BW, Kuo CC, Tsai C, Chu TS, Huang KH, Wang SM, Lin YH, Chiang CK, Chang HW, Lin CY, Lin LY, Chiu JS, Hu FC, Chueh SC, Ho YL, Liu KL, Lin SL, Yen RF, and Wu KD. (2011). Kidney impairment in primary aldosteronism. *Clin. Chim. Acta*, 412, 1319–1325.
- Xie Z. (2003). Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction. *Ann N Y Acad Sci*, 986, 497–503.
- Xie Z, Wang Y, Liu G, Zolotarjova N, Periyasamy SM, and Askari A. (1996). Similarities and differences between the properties of native and recombinant Na⁺/K⁺-ATPases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 330, 153–162.

- Ye Q, Lai F, Banerjee M, Duan Q, Li Z, Si S, and Xie Z. (2013). Expression of mutant $\alpha 1$ Na/K-ATPase defective in conformational transition attenuates Src-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 288, 5803–14.
- Yingst DR, Davis J, Krenz S, and Schiebinger RJ. (1999). Insights into the mechanism by which inhibition of Na,K-ATPase stimulates aldosterone production. *Metabolism.*, 48, 1167–1171.
- Yingst DR, Davis J, and Schiebinger RJ. (2000). Inhibitors of tyrosine phosphatases block angiotensin II inhibition of Na⁺ pump. *Eur. J. Pharmacol.*, 406, 49–52.
- Yoo D, Kim BY, Campo C, Nance L, King A, Maouyo D, and Welling PA. (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.
- Young LS, Murphy G, Kelly SN, Smith TP, Cunningham SK, and McKenna TJ. (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.
- Young WF. (2007). Primary aldosteronism: renaissance of a syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 66, 607–18.
- Yuan Z, Cai T, Tian J, Ivanov AV, Giovannucci DR, and Xie Z. (2005). Na / K-ATPase tethers Phospholipase C and IP3 receptor into a Calcium-regulatory complex. *Mol. Biol. Cell*, 16, 4034–4045.
- Zheng F, Zhu LM, Nie AF, Li XY, Lin LR, Zhang K, Chen J, Zhou WL, Shen ZJ, Zhu YC, Wang JG, Zhu DL, and Gao PJ. (2015). Clinical characteristics of somatic mutations in chinese patients with aldosterone-producing adenoma. *Hypertension*, 65, 622–28.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

11-DOC	11-Desoxycorticosteron
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AK	Antikörper
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
APA	Aldosteron-produzierendes Adenom
AT1	Angiotensin II Rezeptor Typ 1
ATF	Activating transcription factor
ATP	Adenosintriphosphat
ATP1A1	α -Untereinheit der humanen Na^+/K^+ -ATPase
BSA	Bovines Serum Albumin
CaMK	Calcium/Calmodulin-abhängige Protein Kinase
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
CYP	Cytochrom-P450-Enzyme
CYP11B1	11b-Hydroxylase
CYP11B2	Aldosteronsynthase
CYP17	17-alpha-Hydroxyprogesteron Aldolase
CYP21A2	21-Hydroxylase
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum
G _i	Inhibitorisches G-Protein
G _q	Phospholipase C gekoppeltes G-Protein
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
KCNJ5	Potassium inwardly-rectifying channel subfamily J member 5
LDL	Low-density-Lipoproteine

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
mM	Millimolar
MR	Mineralocorticoidrezeptor
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaAc	Natriumazetat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCKX	Natrium- Ca^{2+} -Kalium-Austauscher
NCX	Natrium- Ca^{2+} -Austauscher
NHE	Natrium-Protonen-Austauscher
NMDG	N-Methyl-D-glucaminchlorid
NURR1	Nuclear receptor related 1 protein
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PHA	Primärer Hyperaldosteronismus
PIP2	Phosphatidylinositoldiphosphat
pH_i	Intrazellulärer pH
pH_o	Extrazellulärer pH
PKC	Phosphokinase C
PKD	Phosphokinase D
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMCA	Plamamembran Ca^{2+} ATPase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rAtp1a1	cDNA der α -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase der Ratte
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium (K^+) channel
RT	Raumtemperatur
SDS	Dodecylsulfat Natriumslaz
SEM	Standarfehler (Standard error of the mean)
SGK1	Serum and glucocorticoid inducible kinase isoform 1
SOC	Store operated Ca^{2+} entry
Src	Sarcoma
StAR	Steroidogenic acute regulatroy protein
TASK	TWIK-related K^+ channel
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
ÜN	über Nacht
V	Volt
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

PUBLIKATIONEN

Publikationen im Zuge der Doktorarbeit

Stindl J, Tauber P, Sterner C, Tegtmeier I, Warth R, Bandulik S (2015): "Pathogenesis of adrenal aldosterone producing adenomas carrying mutations of the Na⁺/K⁺-ATPase" (Endocrinology; accepted)

Monticone S, Bandulik S, **Stindl J**, Zilbermint M, Dedov I, Mulatero P, Allgaeuer M, Lee C-CR, Stratakis C a., Williams T a., and Tiulpakov A. (2015). A Case of Severe Hyperaldosteronism Caused by a De Novo Mutation Affecting a Critical Salt Bridge Kir3.4 Residue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 100, E114–E118.

Kuppusamy M, Caroccia B, **Stindl J**, Bandulik S, Lenzini L, Gioco F, Fishman V, Zanotti G, Gomez-Sanchez CE, Bader M, Warth R, and Rossi GP. (2014). A novel KCNJ5-insT149 somatic mutation close to, but outside, the selectivity filter causes resistant hypertension by loss of selectivity for potassium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, jc20141927.

Tauber P, Penton D, **Stindl J**, Humberg E, Tegtmeier I, Sterner C, Beuschlein F, Reincke M, Barhanin J, Bandulik S, and Warth R. (2014). Pharmacology and pathophysiology of mutated KCNJ5 found in adrenal aldosterone-producing adenomas. *Endocrinology*, 155, 1353–1362.

Williams TA, Monticone S, Schack VR, **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. (2014). Somatic ATP1A1, ATP2B3, and KCNJ5 mutations in aldosterone-producing adenomas. *Hypertension*, 63, 188–195.

Weitere Publikationen

Van den Burg EH*, **Stindl J***, Grund T, Neumann ID, and Strauss O. (2015). Oxytocin Stimulates Extracellular Ca²⁺ influx through TRPV2 channels in hypothalamic neurons to exert its anxiolytic effects. *Neuropsychopharmacology*, 1–10. doi: 10.1038/npp.2015.147.
(* contributed equally)

Genewsky A, Jost I, Busch C, Huber C, **Stindl J**, Skerka C, Zipfel PF, Rohrer B, and Strauß O. (2014). Activation of endogenously expressed ion channels by active complement in the retinal pigment epithelium. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.*

Barro-Soria R, **Stindl J**, Müller C, Foeckler R, Todorov V, Castrop H, and Strauß O. (2012). Angiotensin-2-mediated Ca²⁺ signaling in the retinal pigment epithelium: role of angiotensin-receptor-associated-protein and TRPV2 channel. *PLoS One*, 7, e49624.

Cordeiro S, Seyler S, **Stindl J**, Milenkovic VM, and Strauss O. (2010). Heat-sensitive TRPV channels in retinal pigment epithelial cells: regulation of VEGF-A secretion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 51, 6001–8.

DANKSAGUNG

Zu guter Letzt möchte ich mich gerne bei allen Menschen bedanken, die mich während meiner wissenschaftlichen Tätigkeit unterstützt, motiviert und unterhalten haben.

Allen voran danke ich meinem Doktorvater Prof. Richard Warth, der mich so spontan in die Riege seiner Wissenschaftler aufgenommen hat und durch seine offene, fröhliche Art immer für ein angenehmes Arbeitsklima sorgte. Seine Begeisterung für die Forschung war mir stets eine große Motivation.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Sascha Bandulik bedanken. Für seine gewissenhafte Einführung in die Thematik, die wissenschaftliche Betreuung, die fruchtbaren Diskussionen, die Offenheit eigene Ideen zu entwickeln und umzusetzen und die Korrektur meines schriftlichen Werks. Großer Dank geht auch an die restliche AG Nebenniere, der Meisterin der Zellkultur Ines Tegtmeier für die Unterstützung bei der Zellkultur und Herrn Dr. Tauber für die professionelle Durchführung der Aldosteron-ELISAs. Nicht zu vergessen die fleißige Christina Sterner für die Erstellung der G99R-Mutante und ihre stete Hilfsbereitschaft und Geheimtipps bei der Mutagenese.

All meinen Arbeitskollegen hier am Lehrstuhl für medizinische Zellbiologie (Richard, Ines, Christina, Karo, Markus, Sascha, Philipp, Bianka, der kleinen Julia, big Sara, Catarina, Roland, Michaela, Anna-Lena, Carschten, Evi und Maria) gebührt natürlich generell ein großes Dankeschön dafür, dass sie einfach eine super Gruppe sind und sowohl im Labor als auch privat viel Spaß in den Alltag brachten. Die musikalische Unterhaltung während der Büroarbeit durch Carschten war mir immer eine Freude und er fand auch immer den richtigen Sound für jede Stimmungslage

RIGeL und das Elitenetzwerk Bayern haben mich v.a. durch das große Angebot an Veranstaltungen und Kursen persönlich und wissenschaftlich gefördert.

Ganz besonderer Dank geht ins Allgäu an den Oli, der mich durch die emotionalen Höhen und Tiefen, die die Forschung mit sich bringt, begleitet hat und mir stets zu Seite stand. Bei einer Brise frischer Landluft konnte ich immer hervorragend abschalten.

“If you thought that science was certain - well, that is just an error on your part.”
Richard Feynman