Pathogenese des mutierten Ca^{2+}-Kanals CACNA1H beim primären Hyperaldosteronismus und Rolle der zellulären pH-Homöostase für die Regulation der Aldosteronproduktion in Nebennierenzellen

DISSERTATION

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

vorgelegt von

Florian Gürtler

aus Schwandorf

im Jahr 2021

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von März 2018 bis September 2021 unter der Anleitung von Herrn PD. Dr. rer. nat. Sascha Bandulik am Lehrstuhl für Medizinische Zellbiologie am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:	24.09.2021
Die Arbeit wurde angeleitet von:	PD Dr. rer. nat. Sascha Bandulik
Unterschrift:	_____ (Florian Gürtler)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis **7**
Abkürzungsverzeichnis **9**
Zusammenfassung **13**
Abstract **15**
1 Einleitung **17**
1.1 Die Nebenniere 17
1.1.1 Aufbau und Funktion 17
1.1.2 Steroidhormonbiosynthese 19
1.2 Aldosteron – systemische Regulation und Wirkung 21
1.2.1 Systemische Regulation der Aldosteronproduktion 21
1.2.2 Wirkung von Aldosteron 23
1.3 Zelluläre Mechanismen der Aldosteronsynthese 24
1.3.1 Kalium-induzierte Aldosteronproduktion 25
1.3.2 Angiotensin II-induzierte Aldosteronproduktion 26
1.3.3 Calciumabhängige Regulation der CYP11B2-Expression 27
1.4 Primärer Hyperaldosteronismus 28
1.4.1 APA-assoziierte Mutationen 29
1.4.2 Aldosteron produzierende Zellcluster und bilaterale adrenale Hyperplasie 30
1.4.3 Familiärer Hyperaldosteronismus 31
1.5 T-Typ Calciumkanäle und CACNA1H (CaV3.2) 33
1.5.1 T-Typ Calciumkanäle 33
1.5.2 Struktur von CACNA1H 34
1.5.3 Die Mutante CACNA1H^{M1549V} – was bisher bekannt ist 35
1.6 Der pH-Wert der Zelle und seine Rolle bei der Aldosteronsynthese 36
1.7 Zielsetzung 39
2 Material und Methoden **40**
2.1 Material 40
2.1.1 Chemikalien 40
2.1.2 Enzyme und Kits 42
2.1.3 Oligonukleotide 42
2.1.4 Antikörper 43
2.1.4.1 Primäre Antikörper 43
2.1.4.2 Sekundäre Antikörper 44
2.1.5 Lösungen und Puffer 44

2.1.5.1 Lösungen für Patch Clamp Experimente und Live Cell Imaging 44
2.1.5.2 Lösungen für Proteinisolation und Western Blot 48
2.1.6 Verbrauchsmaterialien 50
2.1.7 Geräte 51
2.1.8 Software 52
2.2 Methoden zur Untersuchung der Pathophysiologie von CACNA1H^{M1549V} 52
2.2.1 Plasmide und Konstrukte 52
2.2.2 Zellkultur und Transfektion 52
2.2.3 Patch Clamp Experimente 53
2.2.4 Intrazelluläre Ca^{2+}-Messungen 54
2.2.5 Intrazelluläre pH-Messungen 55
2.2.6 Statistik 56
2.3 Methoden zur Untersuchung des Einflusses des zellulären pH auf die Aldosteronproduktion 56
2.3.1 Zellkultur und Stimulation 56
2.3.2 Aldosteron-ELISA und Proteinisolation 57
2.3.3 RNA-Isolation und quantitative *real-time* PCR 58
2.3.3.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese durch Reverse Transkription 58
2.3.3.2 Quantitative real-time PCR 58
2.3.4 Proteomanalyse 59
2.3.5 Western Blot 61
2.3.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 61
2.3.5.2 Proteintransfer und Immundetektion 61
2.3.6 Statistik 62
3 Ergebnisse 63
3.1 Funktionelle Untersuchung der CACNA1H^{M1549V}-Mutante im adrenalen Zellmodell 63
3.1.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von Wildtyp und mutiertem CACNA1H in Nebennierenzellen 63
3.1.2 Charakterisierung von CACNA1H^{M1549V} in nicht-adrenalen CHO-Zellen 64
3.1.3 CACNA1H^{M1549V} verstärkt Oszillationen des Membranpotentials in NCI-Zellen 65
3.1.4 Entstehung von Oszillationen abhängig von der extrazellulären Kaliumkonzentration 67
3.1.5 Einfluss der Temperatur auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von CACNA1H in Nebennierenzellen 68
3.1.6 Einfluss der Temperatur auf die Entstehung von Oszillationen des Membranpotentials 70
3.1.7 Na^+-Abhängigkeit des CACNA1H-Stroms 71

3.1.8 Na^+-Abhängigkeit der Membranpotentialoszillationen 72
3.1.9 Einfluss von $CACNA1H^{M1549V}$ auf die intrazelluläre Ca^{2+}-Aktivität bei Raumtemperatur 73
3.1.10 Mibefradil reduziert die erhöhte Ca^{2+}-Aktivität in mit $CACNA1H^{M1549V}$ transfizierten NCI-Zellen 75
3.1.11 Niedrigere Ca^{2+}-Aktivität durch Wegnahme von Na^+ in mit $CACNA1H^{M1549V}$ transfizierten NCI-Zellen 76
3.1.12 Rolle des intrazellulären pH-Werts in mit $CACNA1H^{M1549V}$ transfizierten NCI-Zellen 77
3.1.13 Zusammenfassung der Untersuchungen zur $CACNA1H^{M1549V}$-Mutante 79
3.2 Untersuchungen zum Einfluss des zellulären pH auf die Aldosteronproduktion 80
3.2.1 Einfluss von Ca^{2+}-Signalweg-Inhibitoren auf Kalium-stimulierte NCI-Zellen bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc 80
3.2.2 Einfluss von Ca^{2+}-Signalweg-Inhibitoren auf Ang II-stimulierte NCI-Zellen bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc 82
3.2.3 Einfluss von PKC- und PKD-Inhibitoren auf Ang II-stimulierte NCI-Zellen bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc 83
3.2.4 Proteomanalyse zur Detektion bisher unbekannter Kandidaten mit möglichem Einfluss auf die Aldosteronsynthese 86
3.2.5 mRNA-Expression der bei der Proteomanalyse ausgewählten Kandidaten 88
3.2.6 Erhöhte CYP11B2-, STAR- und CYP21A2-Proteinexpression durch NaAc in Kalium- und Ang II-stimulierten NCI-Zellen 90
3.2.7 Vorläufige Untersuchungen der Proteinexpression der bei der Proteomanalyse ausgewählten Kandidaten 92
3.2.8 Zusammenfassung der Untersuchungen zum Einfluss des zellulären pH auf die Aldosteronproduktion 94
4 Diskussion 95
4.1 Charakterisierung von $CACNA1H^{M1549V}$ im adrenalen Zellmodell 96
4.1.1 Veränderte elektrophysiologische Eigenschaften des mutierten CACNA1H 96
4.1.2 Induktion von Membranpotentialoszillationen durch $CACNA1H^{M1549V}$ 98
4.1.3 Mögliche Rolle einer teilweisen Na^+-Leitfähigkeit von CACNA1H bei der Aldosteronsynthese 99
4.1.4 Temperaturunabhängige Effekte von $CACNA1H^{M1549V}$ 100
4.1.5 Zusammenhang zwischen abnormaler Kanalaktivität von CACNA1H und verändertem Ca^{2+}-Stoffwechsel 102
4.1.6 Änderungen der Ca^{2+}-Aktivität unter Na^+-freien Bedingungen 103
4.2 pH-abhängige Regulation der Aldosteronproduktion 105
4.2.1 pH-Einfluss auf den Ca^{2+}-Signalweg 106
4.2.2 pH-Einfluss auf den PKC- und PKD-Signalweg 108

4.2.3 Weitere pH-abhängige Signalwege in Ang II-stimulierten NCI-Zellen 110
4.2.3.1 Bekannte Enzyme der Steroidhormonbiosynthese 111
4.2.3.2 Weitere Kandidaten mit potentiellem Einfluss auf die Aldosteronsynthese 112
4.3 Fazit 115
5 Literaturverzeichnis 116
6 Anhang 135
6.1 Plasmidkarten 135
6.2 Calciummessungen bei 37°C 135
6.3 Übersicht über die bei der Proteomanalyse erhaltenen potentiellen Kandidaten 137
6.4 Publikationen 138
6.5 Eidesstattliche Erklärung 139
7 Danksagung 140

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der humanen Nebenniere. 18
Abbildung 2: Steroidhormonbiosynthese in der humanen Zona glomerulosa und Zona fasciculata. 20
Abbildung 3: Schema des klassischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). 22
Abbildung 4: Darstellung der Kalium- und Ang II-induzierten Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration in Glomerulosazellen. 26
Abbildung 5: Schematische Darstellung von CACNA1H. 35
Abbildung 6: Wirkungsweise von NaAc zur intrazellulären Protonenbeladung. 57
Abbildung 7: Elektrophysiologische Charakterisierung von $CACNA1H^{M1549V}$ in NCI-Zellen. 64
Abbildung 8: Spannungsabhängigkeit der Peakströme in CHO-Zellen. 65
Abbildung 9: Oszillatorische Änderungen des Membranpotentials in NCI-Zellen, transfiziert mit $CACNA1H^{M1549V}$ (A) oder $CACNA1H^{WT}$ (B). 66
Abbildung 10: Einfluss der extrazellulären K^+-Konzentration auf die Entstehung spontaner Membranpotentialänderungen in NCI-Zellen, transfiziert mit $CACNA1H^{M1549V}$ (A) oder $CACNA1H^{WT}$ (B). 67
Abbildung 11: Elektrophysiologische Eigenschaften von CACNA1H bei 37°C. 69
Abbildung 12: Oszillatorische Änderungen des Membranpotentials in NCI-Zellen, transfiziert mit $CACNA1H^{M1549V}$ (A) oder $CACNA1H^{WT}$ (B), gemessen bei 37°C. 70
Abbildung 13: Einfluss der Entfernung von Na^+ und Ca^{2+} aus der extrazellulären Lösung auf spannungsaktivierte Ströme in NCI -Zellen, transfiziert mit mutiertem $CACNA1H^{M1549V}$ (A) oder Wildtyp-CACNA1H (B). 72
Abbildung 14: Einfluss der Entfernung von Na^+ aus der extrazellulären Lösung auf die Entstehung spontaner Membranpotentialänderungen in NCI-Zellen, transfiziert mit $CACNA1H^{M1549V}$ oder $CACNA1H^{WT}$. 73
Abbildung 15: Basale Ca^{2+}-Aktivität in NCI-Zellen, transfiziert $CACNA1H^{M1549V}$ (rot), $CACNA1H^{WT}$ (blau) oder Kontrollvektor (weiß), gemessen bei Raumtemperatur. 74
Abbildung 16: Effekt des T-Typ Calciumkanal-Inhibitors Mibefradil auf die zytosolische Ca^{2+}-Aktivität in NCI-Zellen, transfiziert $CACNA1H^{M1549V}$ (rot), $CACNA1H^{WT}$ (blau), im Vergleich zu untransfizierten Kontrollzellen (schwarz). 75
Abbildung 17: Einfluss der Entfernung von Na^+ aus der extrazellulären Lösung auf die zytosolische Ca^{2+}-Aktivität in NCI-Zellen, transfiziert mit $CACNA1H^{M1549V}$ oder $CACNA1H^{WT}$ im Vergleich zu untransfizierten Zellen. 76

Abbildung 18: Einfluss der Entfernung von Na^+ aus der extrazellulären Lösung (A) sowie von Natriumacetat (B) auf den intrazellulären pH sowie von NaAc auf die zytosolische Ca^{2+}-Aktivität (C) in NCI-Zellen, transfiziert mit $CACNA1H^{M1549V}$, $CACNA1H^{WT}$ bzw. Kontrollvektor. 78

Abbildung 19: Aldosteronproduktion (A) und CYP11B2-mRNA-Expression (B) in NCI-Zellen, stimuliert mit 15 mM K^+ bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc unter Inhibition des Ca^{2+}-Signalwegs mit Mibefradil oder KN93. 81

Abbildung 20: Aldosteronproduktion (A) und CYP11B2-mRNA-Expression (B) in NCI-Zellen, stimuliert mit 100 nM Ang II bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc unter Inhibition des Ca^{2+}-Signalwegs mit Mibefradil oder KN93. 82

Abbildung 21: Aldosteronproduktion (A) und CYP11B2-mRNA-Expression (B) in NCI-Zellen, stimuliert mit 100 nM Ang II bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc unter Inhibition der Proteinkinase C und der Proteinkinase D. 84

Abbildung 22: mRNA-Expression von NR4A2 (A), HSD3B2 (B), STAR (C) und CYP21A2 (D) in NCI-Zellen, stimuliert mit 100 nM Ang II bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc unter Inhibition der Proteinkinase C und der Proteinkinase D. 85

Abbildung 23: Mittlere Aldosteronwerte der Ansätze für die Proteomanalyse. 87

Abbildung 24: mRNA-Expression von CTTNBP2NL, CIP2A, KCNJ5, GK und APOO in NCI-Zellen, stimuliert mit 15 mM K^+ (A) bzw. 100 nM Ang II (B) bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc. 89

Abbildung 25: Proteinexpression von Aldosteronsynthase (CYP11B2), StAR-Protein und 21-Hydroxylase (CYP21A2) in NCI-Zellen, stimuliert mit 15 mM K^+ bzw. 100 nM Ang II bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc. 91

Abbildung 26: Proteinexpression von CIP2A und PPP2CA (A) sowie von APOO, GK und KCNJ5 (B) in NCI-Zellen, stimuliert mit 15 mM K^+ bzw. 100 nM Ang II bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc. 93

Abbildung 27: Plasmidkarten von pIRES-CD8/$CACNA1H^{WT}$ (A), pIRES-CD8/$CACNA1H^{M1549V}$ (B) und pIRES-CD8 (C) 135

Abbildung 28: Einfluss der extrazellulären K^+-Konzentration auf die Ca^{2+}-Aktivität in NCI-Zellen, transfiziert mit $CACNA1H^{M1549V}$ (rot), $CACNA1H^{WT}$ (blau) oder Kontrollvektor (weiß). 136

Abbildung 29: Übersicht über die bei der Proteomanalyse erhaltenen potentiellen Kandidaten. 137

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar (µmol/l)
11-DOC	11-Deoxycorticosteron
11β-HSD2	11β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2
3β-HSD	3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACTB	β-Actin
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APA	Aldosteronproduzierendes Adenom
APCC	Aldosterone producing cell cluster
APOO	Apolipoprotein O
ARR	Aldosterone-to-renin-ratio
AT_1	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
ATF	Activating transcription factor
ATP	Adenosintriphosphat
ATP1A1	Na^+/K^+-ATPase subunit alpha-1
ATP2B3	Plasmamembran-Ca^{2+}-ATPase 3
BAH	Bilateral adrenal hyperplasia
CACNA1D	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1D (auch CaV1.3)
CACNA1G	Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1G (auch CaV3.1)
CACNA1H	Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1H (auch CaV3.2)
CaMK	Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Kinasen
CaV	Spannungsgesteuerter Calciumkanal
CIP2A	Cancerous inhibitor of PP2A
CLCN2	Chloride channel protein 2
CREB	cAMP response element-binding protein
CTNNB1	β-Catenin
Ctrl	Kontrolle
CTTNBP2NL	CTTNBP2 N terminal-like protein

CYP	Cytochrom P450-Enzyme
CYP11A1	Cholesterol side-chain cleavage-Enzym
CYP11B1	11β-Hydroxylase
CYP11B2	Aldosteronsynthase
CYP17A1	17α-Hydroxylase/17,20-Lyase
CYP21A2	21-Hydroxylase
DAG	Diacylglycerol
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FH	Familiärer Hyperaldosteronismus
g	Erdbeschleunigung
GK	Glycerolkinase
GPCR	G protein-coupled receptor
$G_{\alpha q}$	α-Untereinheit des PLC-gekoppelten G-Proteins
h	Stunden
HDL	High-density-Lipoprotein
HRP	Horseradish peroxidase
HSD3B2	3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2
HVA	High voltage activated
Hz	Hertz
I	Einwärtsstrom
IP_3	Inositol-1,4,5-triphosphat
KCNJ5	G protein-activated inward rectifier potassium channel 4 (auch Kir3.4)
kDa	Kilodalton
LDL	Low-density-Lipoprotein
LVA	Low voltage activated
M	Molar (mol/l)
MAP-Kinase	mitogen-activated Proteinkinase
mg	Milligramm
MICOS	Mitochondrial contact site and cristae organizing system
ml	Milliliter
mM	Millimolar (mmol/l)

MR	Mineralocorticoidrezeptor
ms	Millisekunden
MUT	Mutante
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
n	Anzahl
NaAc	Natriumacetat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCX	Na^+/Ca^{2+}-Austauscher
NHE	Na^+/H^+-Austauscher
nM	Nanomolar (nmol/l)
nm	Nanometer
NMDG	N-Methyl-D-glucamin
NR4A2	Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2 (auch NURR1)
PA	Primärer Hyperaldosteronismus
pA	Pikoampere
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PASNA	Primary aldosteronism, seizures, and neurologic abnormalities
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIP_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran Ca^{2+}-ATPase
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PPP2CA	katalytischen Untereinheit der PP2A
qPCR	Quantitative real-time PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROMK	Renal outer medullary potassium (K^+) channel
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SGK1	Serum-Glucocorticoid-regulierte Kinase 1
STAR	Steroidogenic acute regulatory protein (Genname)
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein (Protein)

TASK	TWIK-related acid-sensitive K^+ channel
TBS-T	Tris Buffered Saline mit Tween-20
U	Unit
V	Volt
V_c	Klemmspannung
V_m	Membranpotential
V_{mc}	Membranpotential bei konstanter Strominjektion
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Primärer Hyperaldosteronismus (PA) ist eine der häufigsten Grunderkrankungen, die zur Entstehung von Bluthochdruck führt. Kennzeichnend dabei ist die unkontrollierte Überproduktion des Mineralocorticoids Aldosteron in Zellen der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde. Aldosteron aktiviert die Na^+-Resorption und K^+-Sekretion in der Niere und trägt somit entscheidend zur Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts bei. Physiologisch erfolgt die Stimulation der Aldosteronproduktion hauptsächlich durch eine erhöhte Plasmakaliumkonzentration und Angiotensin II (Ang II). Beides führt zu einer Depolarisation des Membranpotentials und infolgedessen zum Öffnen spannungsaktivierter Calciumkanäle. Dadurch kommt es zum Anstieg der intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration, wodurch Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Kinasen (CaMK) aktiviert werden und es so letztendlich zu einer erhöhten Expression der Aldosteronsynthase (CYP11B2) kommt. Eine wichtige Rolle spielt hierbei der T-Typ Calciumkanal CACNA1H (CaV3.2). Verschiedene Mutationen dieses Kanals konnten in den vergangenen Jahren auch bei PA-Patienten gefunden werden. Neben Ca^{2+} spielen aber auch weitere Faktoren eine wichtige Rolle bei der Aldosteronsynthese. Der intrazellulären pH-Wert ist einer davon. Über welche Signalwege der pH-Wert Einfluss auf die Aldosteronproduktion nimmt, ist bisher allerdings unklar.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, welche Auswirkung die CACNA1H-Mutation M1549V auf die Kanalfunktion im adrenalen Zellmodell hat. Dies soll zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie dieser Mutation bei der Entstehung von PA führen. Ein weiteres Ziel war, mögliche Signalwege zu entschlüsseln, über welche der intrazelluläre pH die Aldosteronsynthese reguliert.

Mittels Ganzzell Patch Clamp Messungen wurde gezeigt, dass in adrenalen NCI H295R-Zellen $CACNA1H^{M1549V}$ bei physiologischen Ionenkonzentrationen bereits bei stärker hyperpolarisiertem Membranpotential öffnet und somit im Bereich des Ruhemembranpotentials von nativen Glomerulosazellen aktiv ist. Daneben entwickelten Zellen, welche die Mutante überexprimierten, deutliche Oszillationen des Membranpotentials. Weiterhin wurde gezeigt, dass die veränderten elektrophysiologischen Eigenschaften von $CACNA1H^{M1549V}$ zu einer Störung der zellulären Ca^{2+}-Homöostase führen. Zusätzlich wurde die Bedeutung der extrazellulären Na^+-Konzentration untersucht, da T-Typ Calciumkanäle zu einem gewissen Grad auch Na^+-permeabel sind. Die Entfernung von Na^+ aus der extrazellulären Lösung führte in Zellen mit mutiertem Kanal zu einer Reduktion des CACNA1H-Stroms, der Membranpotentialoszillationen und der intrazellulären Ca^{2+}-Aktivität. Weiterhin wurde gezeigt, dass $CACNA1H^{M1549V}$ zu einer intrazellulären Ansäuerung führt, diese Veränderung des pH allerdings nicht ursächlich für die veränderte Ca^{2+}-Aktivität unter

Na^+-freien Bedingungen ist. Die Versuche verdeutlichen somit die Bedeutung von CACNA1H für die Aldosteronsynthese. Gleichzeitig wird klar, wie $CACNA1H^{M1549V}$ zu einer stimulationsunabhängigen Aldosteronproduktion – und somit zum Krankheitsbild des PA – führen kann.

Um zu untersuchen, über welche Signalwege der intrazelluläre pH-Wert die Aldosteronproduktion beeinflusst, wurden Zellen mit Kalium oder Ang II und zusätzlich Natriumacetat (NaAc) stimuliert. Gleichzeitig wurden verschiedene Signalwege durch entsprechende Inhibitoren gehemmt. Zunächst zeigte sich, dass NaAc die Kalium- und Ang II-stimulierte Aldosteronproduktion verstärkt. Durch Hemmung von spannungsgesteuerten Calciumkanälen und CaMK wurde deutlich, dass dieser NaAc-Effekt teilweise Ca^{2+}-vermittelt ist. Insbesondere bei Ang II-Stimulation werden jedoch weitere pH-abhängige Signalwege aktiviert. Eine Hemmung der Proteinkinase C (PKC) und der Proteinkinase D (PKD) zeigte, dass vor allem die PKD in Ang II-stimulierten NCI-Zellen für die Aldosteronsynthese wichtig ist und dieser Signalweg auch durch den pH-Wert beeinflusst wird. Allerdings scheint die PKD die Aldosteronsynthese vornehmlich über StAR und CYP21A2 zu regulieren, während CYP11B2 dabei eine eher untergeordnete Rolle einnimmt. Des Weiteren wurde eine Proteomanalyse durchgeführt, wobei unstimulierte und verschieden stimulierte Zellen miteinander verglichen wurden. Hiermit sollten weitere Proteine identifiziert werden, die bisher im Zusammenhang mit Aldosteron und dessen Regulation unbekannt waren und deren Expression auch durch NaAc beeinflusst wird. Die erhaltenen Kandidaten sollten jedoch in unabhängigen Experimenten nochmals bestätigt werden. Dazu wurden erste Vorversuche durchgeführt, die die Ergebnisse der Proteomanalyse nur teilweise bestätigen. Jedoch sind weitere Versuche nötig, um zu klären, über welche genauen Mechanismen der pH-Wert die Aldosteronsynthese beeinflusst.

Abstract

Primary hyperaldosteronism (PA) is one of the most common underlying diseases leading to hypertension. PA is characterized by an uncontrolled overproduction of the mineralocorticoid aldosterone in *zona glomerulosa* cells of the adrenal cortex. Aldosterone activates Na^+ reabsorption and K^+ secretion in the kidney and thus contributes decisively to the regulation of electrolyte and water balance. Physiologically, aldosterone production is mainly stimulated by increased plasma potassium concentration and angiotensin II (Ang II). Both lead to a depolarization of the membrane potential and therefore to the opening of voltage-dependent calcium channels. This results in an increase in intracellular Ca^{2+} concentration, which in turn activates Ca^{2+}/calmodulin-dependent kinases (CaMK) and finally to an increased expression of aldosterone synthase (CYP11B2). The T-type calcium channel CACNA1H (CaV3.2) plays an important role during this process. In the past years, various mutations of this channel have been found in PA patients. Though, other factors besides Ca^{2+} also play an important role in aldosterone synthesis. One of them is the intracellular pH. However, the signaling pathways by which pH can affect aldosterone production remain still unclear.

One aim of the present study was to investigate the influence of the CACNA1H mutation M1549V on channel function in an adrenal cell model. This should lead to a better understanding of the pathophysiology of this mutation in the development of PA. Another aim was to identify possible signaling pathways of intracellular pH regulating aldosterone synthesis.

Using whole-cell patch clamp measurements, it was demonstrated that in adrenal NCI-H295R cells, $CACNA1H^{M1549V}$ opens at a more hyperpolarized membrane potential in presence of physiological ion concentrations. Thus, it is already active in the range of the resting membrane potential of native glomerulosa cells. In addition, cells overexpressing the mutant channel developed marked oscillations of the membrane potential. Furthermore, it was shown that the altered electrophysiological properties of $CACNA1H^{M1549V}$ lead to a disturbance of cellular Ca^{2+} homeostasis. Moreover, the importance of extracellular Na^+ concentration was investigated because T-type calcium channels are also Na^+ permeable to some extent. In cells transfected with the mutant channel, Na^+ removal from extracellular solution resulted in reduction of CACNA1H current, membrane potential oscillations, and intracellular Ca^{2+} activity. Furthermore, $CACNA1H^{M1549V}$ led to intracellular acidification, but this change in pH was not causative for the altered Ca^{2+} activity under Na^+-free conditions. These experiments highlight the importance of CACNA1H for aldosterone synthesis. Moreover, these experiments demonstrate how $CACNA1H^{M1549V}$ can lead to aldosterone production independent of stimulation - and thus to the clinical picture of PA.

To investigate the signaling pathways by which intracellular pH influences aldosterone production, cells were stimulated with either potassium or Ang II and sodium acetate (NaAc) at the same time. Additionally, different signaling pathways were blocked by appropriate inhibitors. First, NaAc was shown to enhance potassium- and Ang II-stimulated aldosterone production. Inhibition of voltage-gated calcium channels and CaMK revealed a partially Ca^{2+} mediated NaAc effect. However, other pH-dependent signaling pathways are activated, particularly with Ang II stimulation. Inhibition of protein kinase C (PKC) and protein kinase D (PKD) showed that especially PKD is important for aldosterone synthesis in Ang II-stimulated NCI cells and that this pathway is also affected by pH. PKD, however, seems to regulate aldosterone synthesis primarily via StAR and CYP21A2, whereas CYP11B2 plays a rather subordinate role. Additionally, a proteomic analysis was performed comparing unstimulated and differently stimulated cells. The goal was to identify further proteins that were previously unknown in the context of aldosterone and its regulation and whose expression is also affected by NaAc. Nevertheless, the candidates obtained still had to be confirmed in independent experiments. For this purpose, preliminary experiments were performed, which partially confirmed the results of the proteomic analysis. However, further experiments need to be done to reveal the exact mechanisms by which pH affects aldosterone synthesis.

1 Einleitung

Bluthochdruck ist eine der am weitesten verbreiteten Volkskrankheiten unserer Zeit. Davon betroffen sind weltweit etwa 30 – 45 % der Erwachsenen (Williams et al. 2018; Chow et al. 2013). Außerdem ist die arterielle Hypertonie weltweit der häufigste Grund für vorzeitige Todesfälle aufgrund von Herzinfarkt oder Schlaganfall (Forouzanfar et al. 2017). Neben den kardiovaskulären Erkrankungen ist Hypertonie aber auch ein Risikofaktor für die Entstehung sowohl von Nierenerkrankungen (Lewington et al. 2002) als auch neurodegenerativen und kognitiven Erkrankungen wie beispielsweise Demenz (Rovio et al. 2017; Gottesman et al. 2017). Mehr als 90 % der betroffenen Patienten leiden dabei an sogenannter primärer oder essentieller Hypertonie. Das bedeutet, dass hier keine eindeutige Ursache für die Erhöhung des Blutdrucks ausgemacht werden kann. Nur etwa 10 % der Patienten entwickeln Hypertonie als Folge einer anderen Grunderkrankung. Man spricht in diesem Fall von sekundärer Hypertonie (Rimoldi et al. 2014). Der Primäre Hyperaldosteronismus (PA) ist eine der häufigsten dieser Grunderkrankungen (Galati et al. 2016; Monticone et al. 2017; Käyser et al. 2018). Das vornehmlich in der Nebenniere gebildete Aldosteron führt in der Niere zu einer vermehrten Rückresorption von Natrium bei einer gleichzeitig verstärkten Kaliumsekretion. Aldosteron ist daher ein wichtiger Regulator des Wasser- und Elektrolythaushalts und beeinflusst somit den arteriellen Blutdruck.

1.1 Die Nebenniere

1.1.1 Aufbau und Funktion

Die Nebennieren sind ein paarig angelegtes Organ, das sich an den oberen Polen der Nieren befindet. Sie werden von einer Bindegewebskapsel umschlossen und bestehen anatomisch und funktionell aus zwei Teilen: der Nebennierenrinde (Cortex) und dem Nebennierenmark (Medulla). Das im Inneren liegende Mark ist ektodermalen Ursprungs und entsteht aus Zellen der Neuralleiste. Den Hauptteil der Zellen der Medulla bilden die chromaffinen Zellen. Diese bilden die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin, deren Sekretion durch Reize aus dem zentralen Nervensystem stimuliert wird (Cooper et al. 1990; Aunis und Langley 1999; Diego et al. 2008). Der Cortex hingegen ist mesodermalen Ursprungs und lässt sich sowohl morphologisch als auch funktionell in drei Teile unterteilen: *Zona glomerulosa, Zona fasciculata* und *Zona reticularis* (vgl. Abbildung 1). Die *Zona reticularis* ist der innerste Teil der Nebennierenrinde und grenzt an das Mark. Sie besteht aus

kleinen, netzartig angeordneten Zellen, die hauptsächlich Androgene wie Dehydroepiandrosteron (DHEA) bilden (Rainey und Nakamura 2008). Die mittlere Schicht, die *Zona fasciculata*, besteht aus säulenartig senkrecht zur Organoberfläche angeordneten Zellen. Diese sind reich an Lipiden und bilden hauptsächlich Glucocorticoide wie Cortisol (Hyatt et al. 1983). Die äußere Schicht der Nebennierenrinde besteht aus kleinen, knäuelförmig angeordneten Zellen. Sie wird daher *Zona glomerulosa* genannt. Diese Zellen sezernieren das Mineralocorticoid Aldosteron (Giroud et al. 1956). Für die zonenspezifische Bildung der verschiedenen Steroidhormone verantwortlich ist dabei die Expression bestimmter steroidogener Enzyme. Die wichtigsten dieser Enzyme sind die Aldosteronsynthase (CYP11B2) und die 11β-Hydroxylase (CYP11B1). Dabei wird die 11β-Hydroxylase, die den letzten Schritt der Cortisolsynthese katalysiert, in den Zellen der *Zona fasciculata* exprimiert. Die Aldosteronsynthase, die für die letzten Schritte der Aldosteronbildung verantwortlich ist, wird hingegen ausschließlich in der *Zona glomerulosa* gebildet (Kawamoto et al. 1992; Peter et al. 1999; Young et al. 2003).

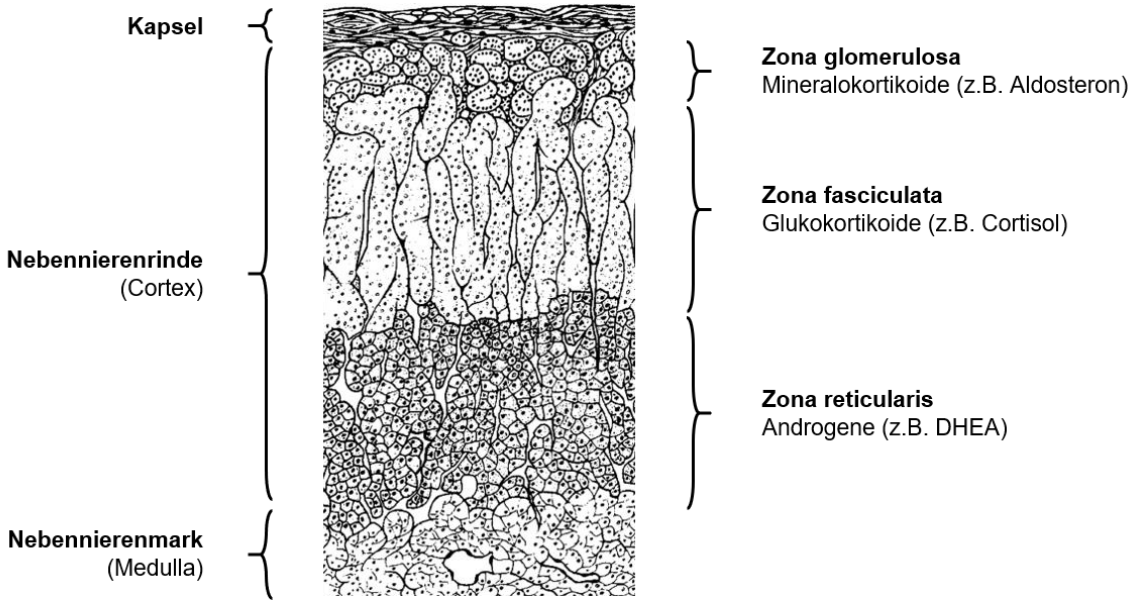


Abbildung 1: ***Schematische Darstellung der humanen Nebenniere.*** *Die Abbildung zeigt einen schematischen Querschnitt der einzelnen Zonen der Nebenniere. Unterhalb der bindegewebigen Kapsel befindet sich die Nebennierenrinde. Diese lässt sich weiter in drei Bereiche unterteilen:* Zona glomerulosa, Zona fasciculata *und* Zona reticularis *(von außen nach innen). In der Nebennierenrinde werden zonenspezifisch Steroidhormone gebildet: Mineralocorticoide in der* Zona glomerulosa*, Glucocorticoide in der* Zona fasciculata *und Androgene in der* Zona reticularis*. Die Nebennierenrinde umschließt das Nebennierenmark, in dem hauptsächlich Katecholamine wie Adrenalin und Noradrenalin gebildet werden. (modifiziert nach Schiebler 2005)*

1.1.2 Steroidhormonbiosynthese

Ausgangsstoff für die Synthese aller Steroidhormone ist Cholesterol. Dieses wird von den Zellen der Nebenniere hauptsächlich über Endozytose von *low-density*-Lipoproteinen (LDL) und *high-density*-Lipoproteinen (HDL) aus dem Plasma aufgenommen. Intrazellulär wird das an die Lipoproteine gebundene Cholesterol abgespalten und kann für die Steroidhormonbiosynthese verwendet werden. Außerdem kann Cholesterol von den Nebennierenzellen auch *de novo* aus Acetyl-Coenzym-A synthetisiert werden (Mason und Rainey 1987; Temel et al. 1997; Capponi 2002). Die einzelnen Schritte der Steroidhormonbiosynthese sind in Abbildung 2 dargestellt und werden im Folgenden erklärt.

Da die ersten Enzyme der Steroidhormonsynthese in der Mitochondrienmatrix lokalisiert sind, wird Cholesterol zunächst durch das *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR) von der äußeren an die innere Mitochondrienmembran transportiert. Dieser Vorgang beeinflusst maßgeblich die Syntheserate und unterliegt deshalb einer komplexen Regulation (Lin et al. 1995; Arakane et al. 1998; Stocco 2001; Stocco et al. 2005). Nach dem Transport ins Mitochondrium wird Cholesterol vom *Cholesterol side-chain cleavage*-Enzym (CYP11A1) durch Abspaltung der Seitenkette und der Bildung einer Ketogruppe am C_{20}-Kohlenstoff zu Pregnenolon umgesetzt (Lieberman und Lin 2001). CYP11A1 gehört zu den Cytochrom P450-Enzymen (CYP). Dabei handelt es sich um eine Superfamilie von Monooxigenasen, deren Gemeinsamkeit eine Häm-Gruppe im aktiven Zentrum ist. Außerdem nutzen viele CYP-Enzyme NADPH als Coenzym (Danielson 2002).Pregnenolon gelangt aus den Mitochondrien an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER), wo es durch das Enzym 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3β-HSD, HSD3B) zu Progesteron umgewandelt wird (Lachance et al. 1990). Dabei existieren zwei humane Isoformen der 3β-HSD: HSD3B1 und HSD3B2. Während HSD3B1 hauptsächlich in der Plazenta gebildet wird, ist HSD3B2 die in der Nebenniere vorherrschende Isoform (Rhéaume et al. 1991).

Durch Hydroxylierung am C_{21}-Atom entsteht in einem weiteren Schritt aus Progesteron 11-Deoxycorticosteron (11-DOC). Die Reaktion wird durch das Enzym 21-Hydroxylase (CYP21A2) katalysiert (Takemori und Kominami 1984; Pallan et al. 2015). In den Mitochondrien wird schließlich 11-DOC durch die Aldosteronsynthase (CYP11B2) in einem dreistufigen Prozess zu Aldosteron umgewandelt. Dabei werden durch das Enzym zunächst Hydroxylgruppen am C_{11}- und am C_{18}-Atom angefügt und letztere anschließend zum Aldehyd oxidiert (Wada et al. 1985; Payne und Hales 2004).

Die Synthese des Glucocorticoids Cortisol in der *Zona fasciculata* erfolgt ausgehend von Cholesterol bis zu Progesteron identisch zur Aldosteronsynthese in der *Zona glomerulosa*. Allerdings muss zur Bildung von Glucocorticoiden eine weitere Hydroxylgruppe am C_{17}-Kohlenstoff angefügt werden.

Diese Reaktion wird durch die 17α-Hydroxylase-Aktivität des Enzyms 17α-Hydroxylase/17,20-Lyase (CYP17A1) katalysiert (Petrunak et al. 2014). CYP21A2 katalysiert anschließend die Umwandlung in 11-Deoxycortisol. Der letzte Schritt der Glucocorticoidsynthese, die Hydroxylierung von 11-Deoxycortisol zu Cortisol, erfolgt durch das Enzym 11β-Hydroxylase (CYP11B1), dessen Sequenz zu 93 % identisch mit der Sequenz der Aldosteronsynthase ist (Curnow et al. 1991; Kawamoto et al. 1992).

Die Bildung der Androgene in der *Zona reticularis* wird ebenfalls durch CYP17A1 katalysiert. Dafür verantwortlich ist die 17,20-Lyase-Aktivität des Enzyms. (Petrunak et al. 2014). Ein wichtiger Co-Faktor dieser Reaktion ist Cytochrom b5, welches in der Nebennierenrinde fast ausschließlich in der *Zona reticularis* lokalisiert ist (Rainey und Nakamura 2008).

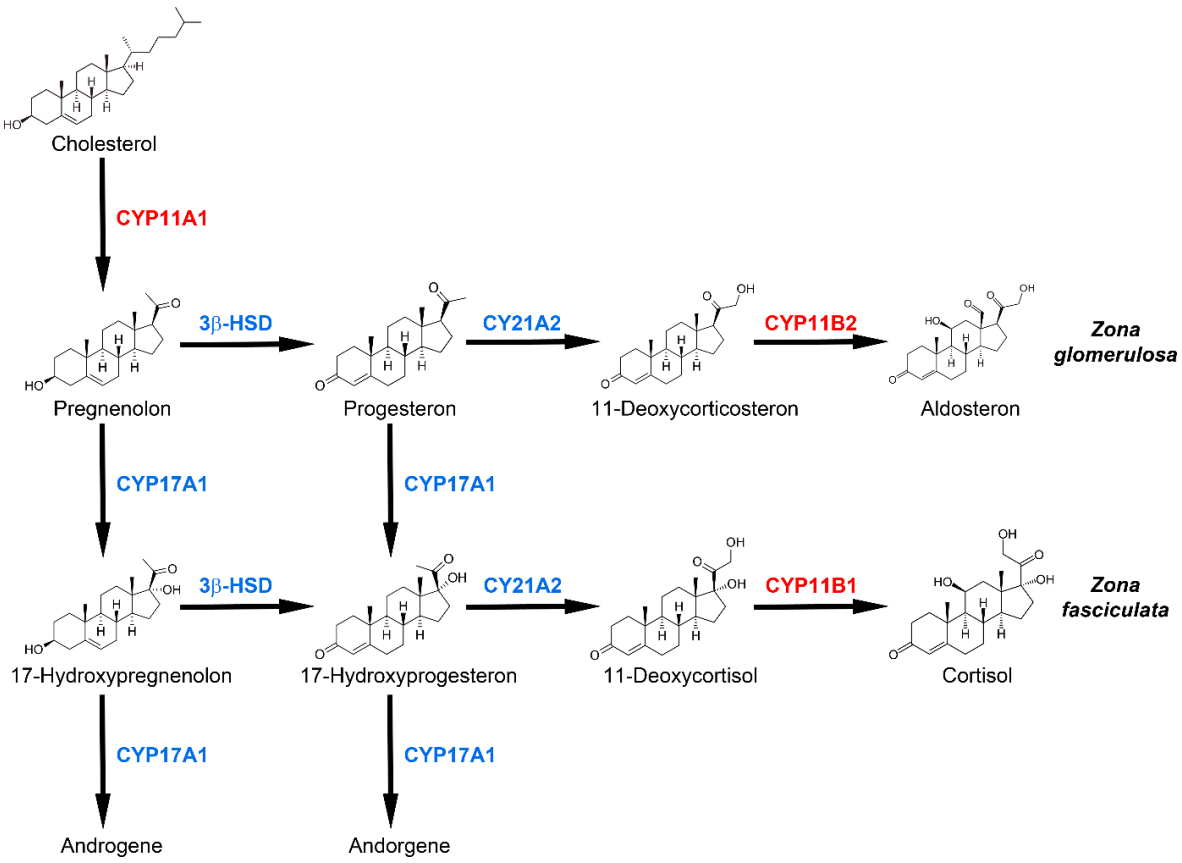


Abbildung 2: ***Steroidhormonbiosynthese in der humanen* Zona glomerulosa *und* Zona fasciculata.** *Gezeigt ist die Synthese der Steroidhormone Aldosteron und Cortisol wie im Text beschrieben. Die Synthese der Androgene in der* Zona reticularis *ist nur angedeutet. Enzyme in roter Schrift sind in den Mitochondrien, Enzyme in blauer Schrift im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert.*

Neben den Enzymen, die sowohl in der *Zona glomerulosa* als auch der *Zona fasciculata* exprimiert werden, sind letztlich die Bildung der Aldosteronsynthase sowie das Fehlen der CYP17A1 in der *Zona glomerulosa* verantwortlich für die Bildung von Aldosteron. Für die Glucocorticoidsynthese hingegen sind die CYP17A1 sowie die 11β-Hydroxylase in der *Zona fasciculata* essentiell.

1.2 Aldosteron – systemische Regulation und Wirkung

1.2.1 Systemische Regulation der Aldosteronproduktion

Die Produktion und Sekretion des Steroidhormons Aldosteron unterliegt einer strengen Regulation. Die wichtigsten systemischen Bedingungen, die eine Freisetzung des Hormons bewirken, sind erhöhte Plasmakaliumspiegel (Hyperkaliämie), ein Abfall des Blutdrucks sowie Hyponatriämie. Die Hyperkaliämie wirkt dabei direkt auf die Zellen der *Zona glomerulosa*. Der genaue Mechanismus dabei wird unter 1.3.1 näher erläutert.

Sowohl Hyponatriämie als auch ein zu niedriger Blutdruck stimulieren die Aldosteronproduktion indirekt über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Renin ist eine Protease, die in den juxtaglomerulären Zellen der Niere synthetisiert und in Granula gespeichert wird. Die wichtigsten Stimuli, die zu einer Freisetzung von Renin führen, sind ein Abfall des renalen Perfusionsdrucks, eine zu geringe NaCl-Konzentration an der Macula densa, welche benachbart zu den juxtaglomerolären Zellen liegt, sowie eine Aktivierung sympathischer Nerven. Über einen negativen Feedback-Mechanismus hemmt Angiotensin II die Sekretion von Renin. Durch diese strenge Kontrolle stellt die Reninfreisetzung das Schlüsselereignis für das RAAS dar. Renin spaltet im Plasma den N-terminalen Teil von Angiotensinogen, einem hauptsächlich in der Leber gebildeten Globulin, welches aus 485 Aminosäuren besteht. Durch diese Spaltung, welche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des RAAS ist, entsteht das biologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I (Ang I). Durch die weitere Abspaltung der beiden C-terminalen Aminosäuren durch das *Angiotensin converting enzyme* (ACE) entsteht das biologisch wirksame Oktapeptid Angiotensin II (Ang II). ACE ist eine membrangebundene Exopeptidase, die insbesondere von Endothelzellen in der Lunge, aber auch in der Niere und im Gehirn exprimiert wird. Eine lösliche Form von ACE kann in geringer Konzentration auch im Plasma gefunden werden. Die Wirkung von Ang II wird durch Bindung an den Angiotensin-Rezeptor (AT), einen *G protein-coupled receptor* (GPCR), vermittelt. Dabei gibt es vier Isoformen von Ang II-Rezeptoren, wobei der Großteil der klassischen Ang II-Effekte durch den AT_1-Rezeptor vermittelt wird. Zu diesen Effekten zählt beispielsweise eine verstärkte Vasokon-

striktion, eine erhöhte Na^+-Reabsorption in der Niere und eine Verstärkung des Durstgefühls und des Salzappetits im Gehirn. In der Nebenniere bewirkt die Bindung von Ang II an den AT_1-Rezeptor eine gesteigerte Aldosteronproduktion. Alle diese Effekte zielen letztlich darauf ab, die ursprüngliche Hyponatriämie bzw. den Abfall des Blutdrucks auszugleichen (vgl. Abbildung 3). Um jedoch eine übermäßige Reaktion des RAAS zu verhindern, führt Ang II wie bereits erwähnt zu einer negativen Regulation der Reninausschüttung. Von den weiteren Angiotensin-Rezeptoren wird der AT_2 überwiegend während der fetalen Entwicklung exprimiert und spielt nach der Geburt nur noch eine untergeordnete Rolle. Die Funktion von AT_3 und AT_4 dagegen ist noch nicht abschließend geklärt (Atlas 2007).

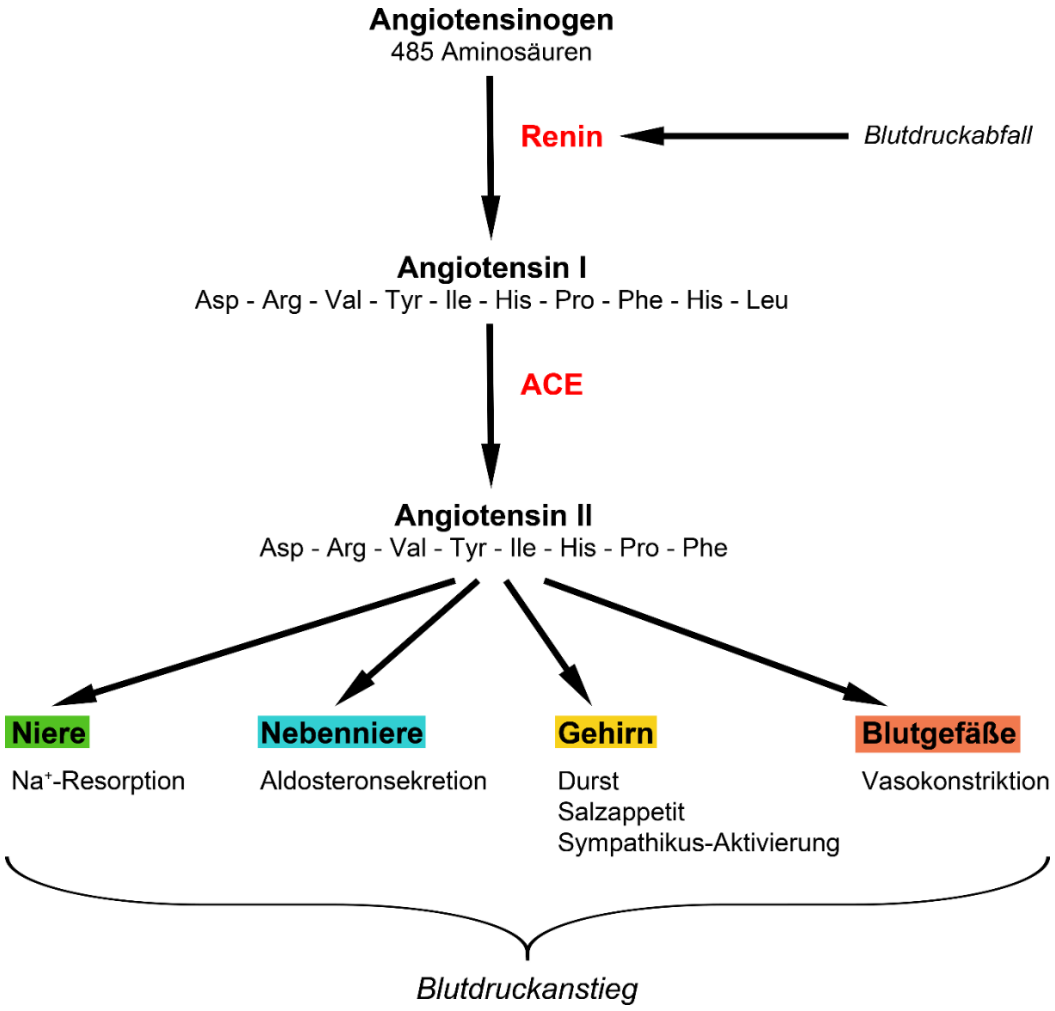


Abbildung 3: ***Schema des klassischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS).*** *Durch einen Abfall des Blutdrucks kommt es zur Reninfreisetzung und letztendlich zur Bildung von Angiotensin II (Ang II). Ang II bewirkt die Aldosteronfreisetzung in der Nebenniere und wirkt auf weitere Organe wie Niere, Gehirn und Gefäße. Letztendlich kommt es durch Ang II und Aldosteron wieder zu einem Blutdruckanstieg. Dargestellt sind die wichtigsten Komponenten des RAAS, die beiden Proteasen Renin und* Angiotensin converting enzyme *(ACE) sind in Rot dargestellt. Für das Dekapeptid Ang I und das Oktapeptid Ang II sind jeweils die Aminosäuresequenzen angegeben.*

Neben dem klassischen systemischen RAAS gibt es in einigen Geweben und Organen wie dem zentralen Nervensystem (ZNS), Fettgewebe, Niere oder Herz, aber auch den Nebennieren eigene lokale RAAS, welche dort sowohl autokrin als auch parakrin wirken können und so eine wichtige Rolle in der Funktion der jeweiligen Gewebe spielen (Paul et al. 2006; Nehme et al. 2019).

1.2.2 Wirkung von Aldosteron

Die Aufgabe der Mineralocorticoide ist die Regulierung des Salz- und Wasserhaushalts im Körper. Somit sind sie maßgeblich an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Aldosteron, der wichtigste Vertreter der Mineralocorticoide, vermittelt seine Effekte durch Bindung an den Mineralocorticoidrezeptor (MR). Dabei handelt es sich um einen ligandengesteuerten Transkriptionsfaktor, der vornehmlich in Epithelien exprimiert wird, die an der Ausscheidung bzw. Aufnahme von Na^+ beteiligt sind. Zu diesen zählen neben Kolon, Schweiß- und Speicheldrüsen vor allem die distalen Abschnitte des Nephrons in der Niere. In Abwesenheit von Aldosteron liegt der MR vornehmlich an *heat shock* Proteine gebunden im Zytosol vor, kann aber teilweise auch bereits im Zellkern gefunden werden (Evans 1988; Alnemri et al. 1991; Robertson et al. 1993; Fejes-Tóth et al. 1998; Fuller und Young 2005). Allerdings zeigt der MR eine ähnlich hohe Affinität zu Glucocorticoiden wie zu Aldosteron und sogar eine höhere Affinität zu Glucocorticoiden als der eigentliche Glucocorticoidrezeptor (Krozowski und Funder 1983; Arriza et al. 1987; Rupprecht et al. 1993). Um zu verhindern, dass die Mehrzahl der MR-Moleküle von Glucocorticoiden gebunden wird, deren Plasmakonzentration ca. 100 – 1000-mal höher ist als die Konzentration an Mineralocorticoiden, exprimieren die Zellen den MR zusammen mit dem Enzym 11β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 (11β-HSD2). Dieses wandelt Cortisol in die inaktive Form Cortison um, welches dann nicht mehr in der Lage ist, an den MR zu binden (White et al. 1997; Odermatt et al. 2001).

Durch die Bindung von Aldosteron kommt es zur Dimerisierung des MR und zur anschließenden Translokation in den Zellkern, wo dann die Expression bestimmter Gene reguliert wird (Trapp und Holsboer 1995; Fejes-Tóth et al. 1998; Rogerson und Fuller 2000). Wichtig für die Natriumresorption in den Hauptzellen des Sammelrohrs der Niere sowie die Natriumabsorption im Kolon sind der apikal gelegene epitheliale Natriumkanal (ENaC) sowie die basolateral gelegene Na^+/K^+-ATPase (Rogerson und Fuller 2000). Eine zentrale Rolle bei der Wirkung von Aldosteron kommt der Serum-Glucocorticoid-regulierten Kinase 1 (SGK1) zu, die vor allem für die schnellen Effekte von Aldosteron verantwortlich ist (Chen et al. 1999; Bhargava et al. 2001; Muller et al. 2003; McCormick et al. 2005). Dabei führt SGK1 zu einer erhöhten Membrandichte des ENaC und des Kaliumkanals ROMK (Loffing et al. 2001; Yoo et al. 2003; McCormick et al. 2005). Außerdem

phosphoryliert SGK1 die Ubiquitin-Proteinligase Nedd4-2, welche für den Abbau von ENaC durch Ubiquitinylierung verantwortlich ist. Durch die Phosphorylierung kommt es zur Inaktivierung von Nedd4-2 und dadurch zu einem reduzierten Abbau von ENaC (Debonneville et al. 2001; Snyder et al. 2002). Zusätzlich führt Aldosteron zu einer verstärken Expression sowie Membranverfügbarkeit der basolateral gelegenen Na^+/K^+-ATPase (Kolla und Litwack 2000; Summa et al. 2001). Ebenso beeinflusst Aldosteron die Aktivität des Na^+/H^+-Austauschers (NHE), wobei die daraus resultierenden Veränderungen des zytosolischen pH wiederum Einfluss auf die Aktivität der Na^+/K^+-ATPase nehmen (Gekle et al. 1996; Musch et al. 2008; Thomas und Harvey 2011). Der Einfluss von Aldosteron auf den Blutdruck resultiert daher, dass als Folge der erhöhten Resorption von Natrium auch vermehrt Wasser aufgenommen wird, das Plasmavolumen dadurch zunimmt und somit der Druck in den Gefäßen ansteigt.

Der MR wird jedoch neben den bereits beschriebenen Epithelien auch noch in einigen anderen Organen exprimiert. Zu diesen zählen das Herz (Lombès et al. 1995), das Gehirn, hier insbesondere der Hippocampus (Reul und Kloet 1985), sowie die Endothelien der Blutgefäße (Takeda et al. 1997). Im Gehirn scheint Aldosteron dabei an der Regulation des Salzappetits und der Entstehung bestimmter Verhaltensweisen beteiligt zu sein, allerdings ist die genaue Bedeutung noch nicht eindeutig geklärt (Sakai et al. 1996; Geerling und Loewy 2009). Weiterhin wurde gezeigt, dass Aldosteron an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt ist sowie die Proliferation von Endothelzellen fördert (Feldman und Gros 2013; Gravez et al. 2015). Allerdings scheint Aldosteron im kardiovaskulären System eher zu pathologischen Effekten zu führen. So wurde gezeigt, dass Aldosteron zu einer verstärkten Fibrose sowie zu kardialer und vaskulärer Inflammation führt (Brilla et al. 1990; Sun et al. 2002; Young 2008). Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass es durch Aldosteron zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und damit zur Entstehung von oxidativem Stress kommt (Johar et al. 2006; Queisser und Schupp 2012). Daneben führt Aldosteron in den Gefäßendothelien zur Anlagerung von Immunzellen und zur Aktivierung von Makrophagen, welche dann proinflammatorische Zytokine produzieren (Caprio et al. 2008; Usher et al. 2010). Die physiologische Relevanz der nicht-epithelialen Aldosteronwirkung – im kardiovaskulären System, aber auch im ZNS – ist jedoch noch immer nicht hinreichend geklärt.

1.3 Zelluläre Mechanismen der Aldosteronsynthese

Auf zellulärer Ebene wird die Aldosteronsynthese durch verschiedene Mechanismen reguliert. Eine erste Steigerung der Aldosteronproduktion erfolgt bereits wenige Minuten nach Beginn der Stimulation, indem verstärkt Cholesterol in die Mitochondrien transportiert wird. Dies geschieht durch

eine verstärkte Expression sowie Phosphorylierung des StAR-Proteins (Arakane et al. 1997; Cherradi et al. 1998; Fleury et al. 2004). Anschließend wird die konstante Synthese von Aldosteron auch durch die Expression der anderen beteiligten Enzyme, besonders CYP11B2, gewährleistet. Dies ist insbesondere bei einer chronischen Stimulation über Stunden bis hin zu mehreren Tagen von Bedeutung (Bassett et al. 2004b; Hattangady et al. 2012). Die beiden physiologisch bedeutendsten Stimuli der Aldosteronsynthese sind Ang II sowie eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration. Eine eher untergeordnete Rolle als Stimulus spielt auch das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH). Einer der wichtigsten physiologischen Inhibitoren der Aldosteronproduktion ist das atriale natriuretische Peptid (ANP) (Atarashi et al. 1984; Aguilera 1987).

1.3.1 Kalium-induzierte Aldosteronproduktion

Glomerulosazellen sind sehr sensitiv für Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration, sodass bereits eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration um 0,5 mM zu einer intrazellulären Ca^{2+}-Antwort führt (Várnai et al. 1998) und bei einer Erhöhung um 1 mM die Aldosteronproduktion sogar verdoppelt wird (Pralong et al. 1992). Verantwortlich dafür ist die hohe Kaliumleitfähigkeit der Glomerulosazellen, durch die ihr Ruhemembranpotential bei ca. -80 mV liegt (Quinn et al. 1987; Lotshaw 1997). Der Grund für die hohe Kaliumleitfähigkeit ist die Expression der konstitutiv geöffneten Kaliumkanäle TASK-1 (KCNK3) und TASK-3 (KCNK9) in der *Zona glomerulosa* (Czirják et al. 2000; Czirják und Enyedi 2002; Lotshaw 2006). Bei einer Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration kommt es zur Depolarisation der Glomerulosazellen. Als Folge dieser Depolarisation öffnen spannungsaktivierte Calciumkanäle und es kommt zum Einstrom von Ca^{2+}-Ionen (vgl. Abbildung 4). Die Zellen besitzen sowohl T-Typ Calciumkanäle, welche bereits bei geringer Depolarisation aktivieren, als auch L-Typ Calciumkanäle, welche erst bei stärkerer Depolarisation öffnen. Dabei scheinen unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich T-Typ Kanäle für den Ca^{2+}-Einstrom verantwortlich zu sein, während der Einstrom durch L-Typ Calciumkanäle erst bei extrazellulären Kaliumkonzentrationen von mehr als 6 mM erfolgt (Durroux et al. 1988; Cohen et al. 1988; Lotshaw 2001). Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration gilt als wichtigster Mediator der erhöhten Aldosteronsynthese nach Kaliumstimulation.

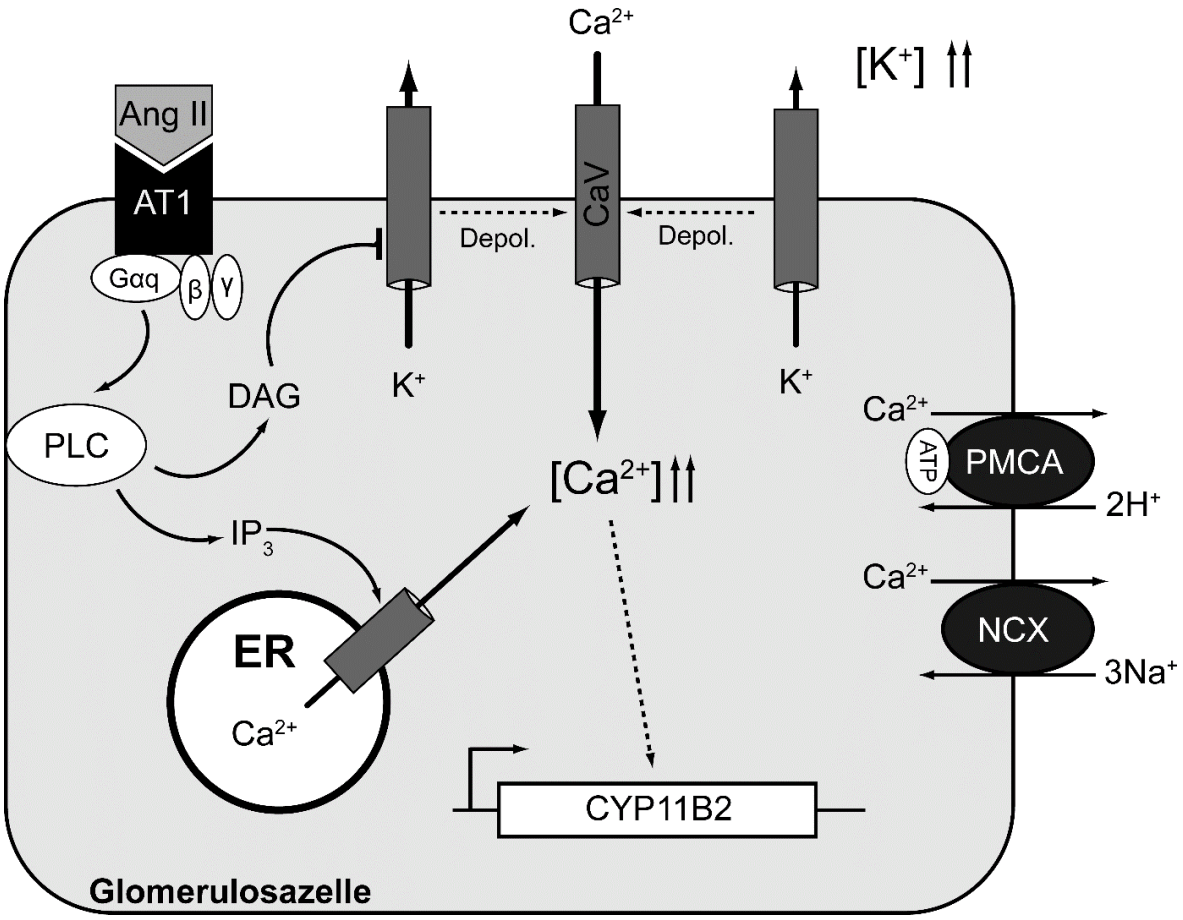


Abbildung 4: ***Darstellung der Kalium- und Ang II-induzierten Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration in Glomerulosazellen.*** *Sowohl eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration als auch Ang II führen zu einer Depolarisation des Membranpotentials und damit zum Öffnen spannungsgesteuerter Calciumkanäle (CaV). Zusätzlich führt Ang II zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER; Details siehe Text). Die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+}-Konzentration führt zu einer verstärkten Expression des CYP11B2-Gens. Um einem Ca^{2+}-Überschuss entgegenzuwirken, wird über die Plasmamembran-Ca^{2+}-ATPase (PMCA) und den Na^+/Ca^{2+}-Austauscher (NCX) Ca^{2+} aus dem Zytosol transportiert. Weitere Abkürzungen: AT1: Ang II-Rezeptor Typ 1; Depol.: Depolarisation; Gαq, β und γ: Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins; PLC: Phospholipase C.*

1.3.2 Angiotensin II-induzierte Aldosteronproduktion

Der zweite wichtige Stimulus der Aldosteronsynthese neben Kalium ist Angiotensin II (Ang II). Dieses bindet, wie oben bereits beschrieben, in der Nebenniere an den AT_1-Rezeptor. Durch diese Bindung kommt es zur Aktivierung des zytosolisch gebundenen G-Proteins und schließlich zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) durch die α-Untereinheit (meist $G_{\alpha q}$) des G-Proteins. Die PLC wiederum hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), wodurch es zur Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) kommt (Farese et al. 1981; Barrett et al. 1989; Hunyady et al. 1990; Bollag et al. 1991; Bird et al. 1993). Anschließend bindet IP_3 in der Membran des ER an den IP_3-Rezeptor, welcher ein ligandgesteuerter Calciumkanal ist. Dadurch

kommt es zur Freisetzung des im ER gespeicherten Ca^{2+} ins Zytosol (Enyedi et al. 1994; Yoshida und Imai 1997). Gleichzeitig hemmt DAG die TASK-Kanäle in der Plasmamembran, welche für das negative Ruhemembranpotential der Glomerulosazellen verantwortlich sind (Wilke et al. 2014). Dadurch kommt es zur Depolarisation und infolgedessen zum Öffnen spannungsgesteuerter Ca^{2+}-Kanäle (vgl. Abbildung 4).

Zusätzlich zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt Ang II zur Aktivierung einer Reihe weiterer Signalwege. So wird über die Bildung von DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert (Nakano et al. 1990; Bollag et al. 1991). Weiterhin führt Ang II zu einer Aktivierung der Phospholipase D, was indirekt ebenfalls zur DAG-Produktion und damit zur Aktivierung der PKC führt (Bollag et al. 1990). Die Aktivierung der PKC wiederum führt zu einer verstärkten Aldosteronproduktion durch Regulation der CYP11B2-Expression, aber auch der Expression und Phosphorylierung des StAR-Proteins. Daneben hat die PKC aber auch Einfluss auf die zelluläre Natriumhomöostase, indem sie beispielsweise die Aktivität des NHE reguliert (Conlin et al. 1991; LeHoux et al. 2001; Betancourt-Calle et al. 2001; Manna et al. 2009). Dabei vermittelt PKC seine Wirkung über die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, beispielsweise des MAP-Kinase-Signalwegs. Auch ein Einfluss auf den zellulären Calciumtransport wurde beschrieben, wobei die PKC gleichermaßen den Einstrom und den Export von Ca^{2+} stimuliert (Cirillo et al. 1998; LeHoux und Lefebvre 2006). Weiterhin aktiviert die PKC auch die Proteinkinase D (PKD), was schlussendlich ebenfalls zu einer erhöhten Aldosteronproduktion führt (Romero et al. 2006; Shapiro et al. 2010; Olala et al. 2014b).

1.3.3 Calciumabhängige Regulation der CYP11B2-Expression

Wie bereits erwähnt, führen sowohl Ang II als auch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration zu einem Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration. Calcium ist der wichtigste intrazelluläre Regulator der CYP11B2-Expression und folglich der Aldosteronsynthese. Dabei bildet Ca^{2+} einen Komplex mit Calmodulin, welcher Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Kinasen (CaMK) aktiviert. Bei der Regulation der Aldosteronproduktion spielen insbesondere die CaMKI und CaMKIV eine Rolle (Condon et al. 2002). CaMK aktivieren Transkriptionsfaktoren, welche dann die Expression des CYP11B2-Gens regulieren. Die wichtigsten dieser Transkriptionsfaktoren sind NR4A2 (NURR1), ATF1, ATF2 und CREB. Sie binden in der Promotorregion des CYP11B2-Gens an *cis*-Elemente und verstärken so die Transkription (Bassett et al. 2004a; Bassett et al. 2004b; Nogueira und Rainey 2010). Dabei scheint insbesondere NR4A2 eine bedeutende Rolle für die Aldosteronproduktion zu spielen, da seine Expression nur in der *Zona glomerulosa*, aber nicht in der benachbarten *Zona fasciculata* nachgewiesen werden konnte (Lu et al. 2004).

Neben seinem Einfluss auf die Expression von CYP11B2 steuert Ca^{2+} die Aldosteronproduktion, indem es den Transport von Cholesterol an die innere Mitochondrienmembran sowie die Produktion von NADPH, einem wichtigen Cofaktor der CYP-Enzyme, reguliert (Cherradi et al. 1996; Rossier et al. 1996a; Cherradi et al. 1997; Wiederkehr et al. 2011).

Um eine übermäßige Aldosteronproduktion zu verhindern, ist es wichtig, die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration nach Stimulation wieder zu senken. Eine wichtige Rolle spielen dabei die Plasmamembran Ca^{2+}-ATPasen (PMCA) sowie der Na^{+}/Ca^{2+}-Austauscher (NCX) (Brini und Carafoli 2011; Bandulik 2017). Die PMCAs transportieren Ca^{2+}-Ionen unter ATP-Hydrolyse aus dem Zytosol, wobei für den Export eines Ca^{2+}-Ions zwei Protonen importiert werden (Thomas 2009). Der NCX wiederum nutzt den einwärtsgerichteten Natriumgradienten, um ein Ca^{2+}-Ion im Austausch für drei Na^{+}-Ionen aus der Zelle zu transportieren (Blaustein und Lederer 1999).

1.4 Primärer Hyperaldosteronismus

Der Primäre Hyperaldosteronismus (engl. *primary aldosteronism*, PA) wurde zuerst 1955 von dem amerikanischen Endokrinologen Jerome W. Conn beschrieben (Conn 1955) und wird daher auch als Conn-Syndrom bezeichnet. Kennzeichnend für diese Erkrankung ist eine erhöhte Aldosteronproduktion der Nebennieren, welche unabhängig von Renin oder der Plasmanatriumkonzentration erfolgt (Funder et al. 2016). Dabei tritt eine Hypokaliämie, welche anfangs noch als zwingendes Kriterium zur Diagnose galt, nur bei einem kleinen Teil der Patienten auf. Beim Großteil der Patienten sind die Plasmakaliumlevel normal (Mulatero et al. 2004; Rossi et al. 2006). Früher wurde davon ausgegangen, dass die Prävalenz des PA sehr gering ist. Neuere Studien legen jedoch die Vermutung nahe, dass ca. 6 % der Patienten mit Hypertonie unter PA leiden. In spezialisierten Hypertoniezentren lag der Anteil sogar bei ca. 10 % (Rossi et al. 2006; Monticone et al. 2017). PA ist damit eine der häufigsten Ursachen für sekundäre Hypertonie. Durch die erhöhten Aldosteronspiegel kommt es zu einer Suppression von Renin. Daher dient der Aldosteron-Renin-Quotient (*aldosterone-to-renin-ratio*, ARR) als wichtiger diagnostischer Parameter. Allerdings sollte die Diagnose bei positiver ARR noch durch einen weiteren Test (z.B. Kochsalzbelastungstest oder Fludrocortison-Suppressionstest) bestätigt werden (Funder et al. 2016).

Die beiden häufigsten Ursachen für PA sind meist unilateral auftretende gutartige Tumore der Nebennierenrinde, sogenannte aldosteronproduzierende Adenome (APA), oder eine bilaterale Nebennierenhyperplasie (*bilateral adrenal hyperplasia*, BAH). Unilaterale Hyperplasien, Nebennierenkarzinome sowie familiäre Formen des Hyperaldosteronismus sind eher seltene Gründe für

die Entstehung von PA. Die Therapie der unilateralen Formen erfolgt meist durch Adrenalektomie, also der operativen Entfernung der betroffenen Nebenniere. Sind wie bei der BAH beide Nebennieren betroffen, sind die Patienten auf eine lebenslange Therapie mit Mineralocorticoidrezeptor-Antagonisten, vor allem Spironolacton, angewiesen (Funder et al. 2016).

1.4.1 APA-assoziierte Mutationen

Durch das Aufkommen neuer Sequenzierungstechniken vor einigen Jahren wurde es möglich, Tumor- und gesundes Gewebe zu vergleichen. So konnten in den Adenomen Genmutationen identifiziert werden, die möglicherweise ursächlich für die gesteigerte Aldosteronproduktion sind. Seitdem wurden zahlreiche Mutationen entdeckt, hauptsächlich in Genen, die für Kanal- und Transportproteine kodieren. In einer Studie, bei der Adenome mittels CYP11B2-Immunhistochemie als APAs klassifiziert wurden, konnte bei 88 % der untersuchten APAs mindestens eine somatische Mutation nachgewiesen werden (Nanba et al. 2018). Am häufigsten treten Mutationen des Gens KCNJ5 auf, welches für den Einwärtsgleichrichter-Kaliumkanal Kir3.4 codiert (Choi et al. 2011). Dabei zeigten ca. 40 % aller Tumore Mutationen in diesem Kanal. Die meisten dieser Mutationen liegen im Bereich des Selektivitätsfilters. Dies führt zu einer Na^+-Permeabilität des Kaliumkanals und infolgedessen zur Depolarisation der Nebennierenzellen, zum Einstrom von Ca^{2+}-Ionen und letztendlich zu einer erhöhten Aldosteronproduktion (Choi et al. 2011; Åkerström et al. 2012; Tauber et al. 2014; Fernandes-Rosa et al. 2014). Am zweithäufigsten treten Mutationen im Gen CACNA1D auf, welches für den L-Typ Calciumkanal CaV1.3 codiert. Diese Mutationen treten mit einer Häufigkeit von ca. 9 – 20 % auf und führen direkt zu einer erhöhten Calciumpermeabilität (Azizan et al. 2013; Scholl et al. 2013; Fernandes-Rosa et al. 2014; Nanba et al. 2018). Weiterhin finden sich Mutationen im Gen ATP1A1, das für die Bildung der α-Untereinheit der Na^+/K^+-ATPase verantwortlich ist (Beuschlein et al. 2013; Azizan et al. 2013). Dabei wird angenommen, dass sich die ATPase durch die Mutationen zu einer Art Ionenkanal für Na^+ und Protonen verändert. Dadurch kommt es ebenfalls zur Depolarisation und folglich zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration. Weiterhin wird davon ausgegangen, dass der durch den H^+-Einstrom veränderte pH-Wert ebenfalls Einfluss auf die Aldosteronproduktion nimmt (Azizan et al. 2013; Kopec et al. 2014; Stindl et al. 2015). Mit einer Häufigkeit von ca. 1 – 4 % eher selten sind Mutationen im Gen ATP2B3, welches für eine Plasmamembran Ca^{2+}-ATPase codiert (Beuschlein et al. 2013; Fernandes-Rosa et al. 2014). Diese Mutationen führen dabei ebenfalls zu einer Na^+-Leitfähigkeit der Ca^{2+}-ATPase und folglich zur Depolarisation. Dies führt zusammen mit der beeinträchtigten Ca^{2+}-Exportfunktion zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration (Tauber et al. 2016). Ebenfalls eher selten sind Mutationen des β-Catenin-Gens CTNNB1 (Åkerström et al. 2016; Wu et al. 2017). Allerdings ist der

genaue Mechanismus, wie β-Catenin die Aldosteronproduktion beeinflusst, noch nicht abschließend geklärt. Es wurde jedoch gezeigt, dass der WNT/β-Catenin-Signalweg in APAs aktiviert ist und dass β-Catenin indirekt über NR4A2 zu einer erhöhten CYP11B2-Expression führt (Berthon et al. 2014). Ebenso wurde berichtet, dass β-Catenin die Aktivität des STAR-Promotors reguliert (Vleugels et al. 2011). Weiterhin wurden vor kurzem auch Patienten mit APA beschrieben, die eine Mutation im CACNA1H-Gen tragen, welches für den T-Typ Calciumkanal CaV3.2 codiert. Dabei führte die Überexpression des mutierten Kanals *in vitro* ebenfalls zu einer erhöhten CYP11B2-Expression und verstärkten Aldosteronproduktion (Nanba et al. 2020).

Das Auftreten der einzelnen Mutationen unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Ethnien und Geschlechtern. Beispielsweise kommen KCNJ5-Mutationen häufiger bei Frauen vor und sind besonders häufig bei asiatischen Patienten. Ebenso sind die Patienten im Durchschnitt jünger und entwickeln größere Tumore. In afroamerikanischen Patienten hingegen treten CACNA1D-Mutationen am häufigsten auf (Taguchi et al. 2012; Lenzini et al. 2015; Nanba et al. 2019).

1.4.2 Aldosteron produzierende Zellcluster und bilaterale adrenale Hyperplasie

Durch die Entwicklung CYP11B2-spezifischer Antikörper (Gomez-Sanchez et al. 2014) wurde es möglich, die Bereiche erhöhter Aldosteronproduktion immunhistologisch sichtbar zu machen. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß eine erhöhte CYP11B2-Expression in APAs. Allerdings konnten auch CYP11B2-positve Zellen außerhalb der Adenome in Bereichen ohne Neoplasie nachgewiesen werden (Nishimoto et al. 2010; Boulkroun et al. 2010). Diese Bereiche werden als Aldosteron produzierende Zellcluster (*aldosterone producing cell cluster*, APCC) bezeichnet. Interessanterweise wurden APCCs nicht nur in den benachbarten Bereichen von Adenomen gefunden, sondern auch in den normalen Nebennieren gesunder Nierenspender (Nishimoto et al. 2015). Weiterhin zeigte sich, dass die Anzahl an APCCs mit steigendem Alter zunimmt, wohingegen das Geschlecht keinen Einfluss auf die Entstehung von APCCs hat (Omata et al. 2017). Durch Sequenzierung wurden sowohl in den APCCs von APA-Patienten als auch in den gesunden Nebennieren bei etwa einem Drittel bekannte Mutationen gefunden, die mit einer erhöhten Aldosteronproduktion assoziiert sind. Dabei traten in beiden Fällen CACNA1D-Mutationen am häufigsten auf, gefolgt von Mutationen in den Genen ATP1A1 und ATP2B3. Jedoch konnten weder bei den APCCs der APA-Patienten noch bei den gesunden Nebennieren Mutationen im KCNJ5-Gen nachgewiesen werden. (Nishimoto et al. 2015; Omata et al. 2017). Es wird vermutet, dass sich APCCs mit der Zeit zu APAs entwickeln können. Nishimoto et al. fanden dabei in den Nebennieren zweier Patienten sogenannte *possible APCC-to-APA transitional lesions* (pAATL), also Bereiche, die sowohl einen APCC-ähnlichen

als auch einen APA-ähnlichen Anteil ohne klare histologische Grenze enthalten (Nishimoto et al. 2016).

Da die bilaterale Nebennierenhyperplasie (BAH) normalerweise mit MR-Antagonisten behandelt wird, ohne dass eine Operation durchgeführt wird, steht von diesen Patienten meist kein Gewebe für genetische Analysen zur Verfügung. Dennoch konnten Omata et al. eine Studie an Gewebe von 15 Patienten durchführen, bei denen trotz BAH eine Nebenniere operativ entfernt worden war (Omata et al. 2018). Dabei fanden sie in jeder Probe mindestens ein CYP11B2-positives APCC, insgesamt wurden 99 APCCs identifiziert und sequenziert. Dabei zeigten 58 % der untersuchten Cluster Mutationen im CACNA1D-Gen, während bei 42 % keine Mutationen vorhanden waren. Bei einem APCC konnte außerdem eine KCNJ5-Mutation nachgewiesen werden (Omata et al. 2018).

1.4.3 Familiärer Hyperaldosteronismus

Während die bisher beschriebenen Fälle von PA – ausgelöst durch APA oder BAH – in der Regel sporadisch auftreten, sind auch seltene Fälle von familiärem Hyperaldosteronismus (FH) bekannt. Die erste Beschreibung eines solchen Falles erfolgte bereits 1966 und wurde als *glucocorticoid-remediable aldosteronism* bezeichnet, da eine Behandlung mit Glucocorticoiden möglich war (Sutherland et al. 1966). Heute wird diese Form als FH-I bezeichnet. Sie wird autosomal-dominant vererbt und tritt bei weniger als 1 % aller PA-Patienten auf (Lenzini et al. 2018). Als genetische Ursache wurde eine Fusion des CYP11B1-Promotors mit der codierenden Sequenz von CYP11B2 identifiziert. Dadurch kommt es zur ACTH-gesteuerten Aldosteronproduktion in der *Zona fasciculata* (Lifton et al. 1992).

Familiäre Fälle von PA, die nicht auf Glucocorticoide ansprachen, sind seit längerem bekannt und wurden als FH-II bezeichnet. Zunächst wurde eine Assoziation zwischen FH-II und einem Lokus auf Chromosom 7 angenommen (Lafferty et al. 2000), doch die genaue genetische Ursache blieb unklar. Erst 2018 wurden Mutationen im Gen CLCN2, das für einen Chloridkanal codiert, im Zusammenhang mit FH-II beschrieben (Fernandes-Rosa et al. 2018; Scholl et al. 2018). Durch die Mutationen kommt es zu einem verstärkten Cl^--Ausstrom und folglich zur Depolarisation. Dies führt über das Öffnen spannungsgesteuerter Ca^{2+}-Kanäle zur Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+}-Konzentration und letztlich zur verstärkten Aldosteronproduktion (Fernandes-Rosa et al. 2018; Scholl et al. 2018). Dabei wurden die von Scholl et al. beschriebenen Mutationen in Familien gefunden, bei denen bereits 1992 FH-II diagnostiziert worden war (Stowasser et al. 1992; Scholl et al. 2018).

Im Jahr 2008 wurde der Fall einer Familie veröffentlicht, bei der der Vater und die beiden Töchter bereits seit dem Kindesalter unter PA litten (Geller et al. 2008). Einige Jahre später konnte nachgewiesen werden, dass diese Patienten Mutationen im KCNJ5-Gen trugen (Choi et al. 2011). Dadurch wurde eine neue Form von familiärem Hyperaldosteronismus identifiziert, die durch KCNJ5-Mutationen gekennzeichnet ist: FH-III. Es wird geschätzt, dass etwa 0,3 % aller PA-Patienten zu dieser Gruppe gehören (Lenzini et al. 2018). Seitdem wurden bei weiteren Familien KCNJ5-Mutationen entdeckt, die zu einem frühen Krankheitsbeginn und einer schweren Form von PA führen (Scholl et al. 2012; Charmandari et al. 2012; Monticone et al. 2015; Tong et al. 2016). Es wurden aber auch Berichte über Familien mit KCNJ5-Mutantionen veröffentlicht, bei denen die Patienten zwar ebenfalls meist einen frühen Krankheitsbeginn hatten, der Krankheitsverlauf aber insgesamt milder war (Mulatero et al. 2012; Scholl et al. 2012; Monticone et al. 2013).

Als Ursache für die vierte Gruppe von familiärem Hyperaldosteronismus (FH-IV) wurden Mutationen im Gen CACNA1H identifiziert, welches für den T-Typ Calciumkanal CaV3.2 kodiert (Scholl et al. 2015; Daniil et al. 2016). Dabei wurden zwei unterschiedliche Mutationen gefunden, welche zur Veränderung derselben Aminosäure führen: M1549V (Scholl et al. 2015) und M1549I (Daniil et al. 2016). Beide Mutationen führen dazu, dass die Patienten bereits vor dem 10. Lebensjahr PA entwickelten (Scholl et al. 2015; Daniil et al. 2016). Außerdem wurden weitere CACNA1H-Mutationen identifiziert, die jedoch zu einer erst später einsetzenden PA-Entwicklung nach dem 30. Lebensfahr führten (Daniil et al. 2016).

Weiterhin konnten bei zwei jungen Patientinnen CACNA1D-Mutationen nachgewiesen werden. Beide Mädchen litten nicht nur unter PA, sondern zeigten auch neurologische Störungen wie Epilepsie und Lähmungen (Scholl et al. 2013). Diese Form wird daher auch als PASNA (*primary aldosteronism, seizures, and neurologic abnormalities*) bezeichnet. Seitdem wurden noch zwei weitere PASNA-Fälle beschrieben, die ebenfalls CACNA1D-Mutationen zeigten (Semenova et al. 2018; Mingo Alemany et al. 2020). Interessanterweise wurden CACNA1D-Mutationen auch bei Patienten mit Autismus-Spektrum-Störungen und Epilepsie gefunden, ohne dass diese einen Hyperaldosteronismus entwickelten (Iossifov et al. 2012; O'Roak et al. 2012; Pinggera et al. 2015; Pinggera et al. 2017). Dabei wird spekuliert, dass bestimmte Mutationen möglicherweise nur zu einer geringen Verstärkung der Kanalfunktion führen und es dadurch zur Bildung des neurologischen Phänotyps mit Autismus-Spektrum-Störungen kommt, während andere Mutationen die Funktion stärker beeinflussen und dadurch zusätzlich ein adrenaler Phänotyp ausgebildet wird (Pinggera et al. 2015).

1.5 T-Typ Calciumkanäle und CACNA1H (CaV3.2)

Der Ca^{2+}-Einstrom über T-Typ Calciumkanäle spielt eine zentrale Rolle bei der Aldosteronsynthese (Cohen et al. 1988; Lotshaw 2001). Weiterhin wurden in den vergangenen Jahren bei Patienten mit familiärem Hyperaldosteronismus, aber auch mit Aldosteron-produzierendem Adenom Mutationen im CACNA1H-Gen gefunden (Scholl et al. 2015; Daniil et al. 2016; Nanba et al. 2020).

1.5.1 T-Typ Calciumkanäle

Bereits 1975 wurde entdeckt, dass es zwei unterschiedliche Gruppen von spannungsgesteuerten Calciumkanälen geben muss: Kanäle, die bereits bei geringer Depolarisation öffnen (*low voltage activated*, LVA) und solche, die eine stärkere Depolarisation benötigen (*high voltage activated*, HVA) (Hagiwara et al. 1975). In der Folge wurden die LVA-Kanäle weiter charakterisiert. Es zeigte sich, dass diese Kanäle im Gegensatz zu HVA-Kanälen bei negativerem Membranpotential aktivieren, rasch inaktivieren und langsam deaktivieren (Carbone und Lux 1984; Fedulova et al. 1985; Nowycky et al. 1985). Daher wurden die LVA-Kanäle auch T-Typ (*transient*) genannt, während die HVA-Kanäle als L-Typ (*long-lasting*) bzw. eine Subgruppe als N-Typ (*neither L nor T*) bezeichnet wurden (Nowycky et al. 1985).

T-Typ Calciumkanäle bilden in Glomerulosazellen den wichtigsten Einstromweg für Ca^{2+}-Ionen, welche letztendlich zur Stimulation der Aldosteronproduktion führen (Rossier et al. 1996b; Rossier et al. 1998; Lotshaw 2001). Ihre Aktivität in der Nebenniere wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Zu diesen gehören, wie bereits beschrieben, eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration sowie Ang II als wichtigste Stimulatoren der Aldosteronproduktion (Cohen et al. 1988; Lotshaw 2001). Außerdem wurde beschrieben, dass T-Typ Ströme durch CaMK verstärkt werden und dass Ca^{2+} und Calmodulin dazu führen, dass die Kanäle bereits bei negativerem Membranpotential aktivieren (Lu et al. 1994; Barrett et al. 2000). Gehemmt werden T-Typ Kanäle in der Nebenniere unter anderem durch ANP (McCarthy et al. 1990; Barrett et al. 1991), aber auch durch den Neurotransmitter Dopamin (Osipenko et al. 1994; Drolet et al. 1997). Außerdem wurde ein hemmender Effekt der PKC auf die Kanalaktivität beschrieben (Rossier et al. 1995). Die Rolle der PKC bei der Regulation der T-Typ Calciumkanäle wird allerdings kontrovers diskutiert. So gibt es Studien vor allem an neuronalen und kardialen Zellen, die eine hemmende Wirkung der PKC beschreiben (Schroeder et al. 1990; Tseng und Boyden 1991), während andererseits in Kardiomyozyten auch eine verstärkende Wirkung beschrieben ist (Furukawa et al. 1992).

T-Typ Calciumkanäle spielen nicht nur bei der Kalium- und Ang II-induzierten Aldosteronproduktion eine Rolle. Bei elektrophysiologischen Messungen an Nebennierenschnitten der Maus wurde entdeckt, dass Glomerulosazellen spontane periodische Oszillationen des Membranpotentials aufweisen und dass T-Typ Calciumkanäle an der Entstehung dieser Oszillationen beteiligt sind (Hu et al. 2012). Die genaue Funktion dieser Oszillationen ist zwar noch unklar, es wird jedoch vermutet, dass sie eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Aldosteronproduktion spielen (Hu et al. 2012; Barrett et al. 2016).

Spannungsgesteuerte Calciumkanäle bestehen aus verschiedenen Untereinheiten (α_1, $\alpha_2\delta$, β und γ), wobei von jeder Untereinheit verschiedene Isoformen bekannt sind. Dabei bildet α_1 die porenbildende Untereinheit (Dolphin 2006). Daher wird im Zusammenhang mit Calciumkanälen häufig nur die α_1-Untereinheit genannt, ohne auf die anderen Untereinheiten näher einzugehen. Es wird davon ausgegangen, dass bei T-Typ Calciumkanälen die α_1-Untereinheit alleine einen funktionsfähigen Kanal bilden kann, ohne dass weitere Untereinheiten nötig sind (Perez-Reyes 2003). Bisher wurden zehn verschiedene α_1-Untereinheiten identifiziert, die sich in die Subfamilien CaV1 (L-Typ), CaV2 (andere HVA-Kanäle, z.B. N-Typ) und CaV3 (T-Typ) unterteilen lassen. Dabei wurden bisher drei verschiedene T-Typ Kanäle beschrieben: CaV3.1 (CACNA1G), CaV3.2 (CACNA1H) und CaV3.3 (CACNA1I) (Perez-Reyes 2003).

1.5.2 Struktur von CACNA1H

Von den drei T-Typ Calciumkanälen wird in der Nebenniere vorrangig CACNA1H exprimiert (Schrier et al. 2001). Die Klonierung von CACNA1H erfolgte erstmals 1998. Zunächst wurde festgestellt, dass das Gen besonders stark in der Niere, der Leber und im Herzen exprimiert wird (Cribbs et al. 1998). Das Protein besteht aus 2.353 Aminosäuren und ist ca. 259 kDa groß (Williams et al. 1999). Weiterhin existiert eine Splicevariante, bei der Exon 26 fehlt. Dies führt zu einer Verkürzung des Proteins um sechs Aminosäuren (Jagannathan et al. 2002). Die Struktur des Kanals besteht aus vier homologen Wiederholungen (I – IV), welche aus jeweils sechs Transmembrandomänen (S1 – S6) bestehen. N- und C-Terminus liegen intrazellulär. Zwischen den Domänen S5 und S6 befindet sich die sogenannte Porenschleife, die teilweise in die Pore ragt. Die eigentliche Pore wird von den S6-Domänen der vier Wiederholungen gebildet, welche tetramerisch angeordnet sind. Als Spannungssensor dienen die S4-Domänen, bei denen etwa jede dritte Aminosäure positiv geladen ist. Die Porenschleifen enthalten eine konservierte Sequenz, deren zentrale Aminosäure positiv geladen ist. Bei den L-Typ Calciumkanälen tritt in allen vier Wiederholungen Glutamat (E) auf, während bei den T-Typ Kanälen in den Wiederholungen III und IV Aspartat (D) vorhanden ist (Perez-Reyes 2003). Dieser sogenannte

EEDD-Lokus bildet den Selektivitätsfilter des Kanals (Talavera et al. 2001; Park et al. 2013). Eine schematische Darstellung von CACNA1H ist in Abbildung 5 gezeigt. Dabei beruht diese Struktur jedoch auf dem Vergleich der Sequenz von CACNA1H mit anderen Calciumkanälen bzw. anderen Ionenkanälen. Die genaue Struktur konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Jedoch wurde 2019 eine hochauflösende Struktur von CACNA1G veröffentlicht, die die bisherigen Annahmen weitgehend bestätigt (Zhao et al. 2019). Da die Sequenzen von CACNA1G und CACNA1H jedoch in großen Teilen konserviert ist (Perez-Reyes 2003), kann davon ausgegangen werden, dass die Annahmen auch auf CACNA1H zutreffen.

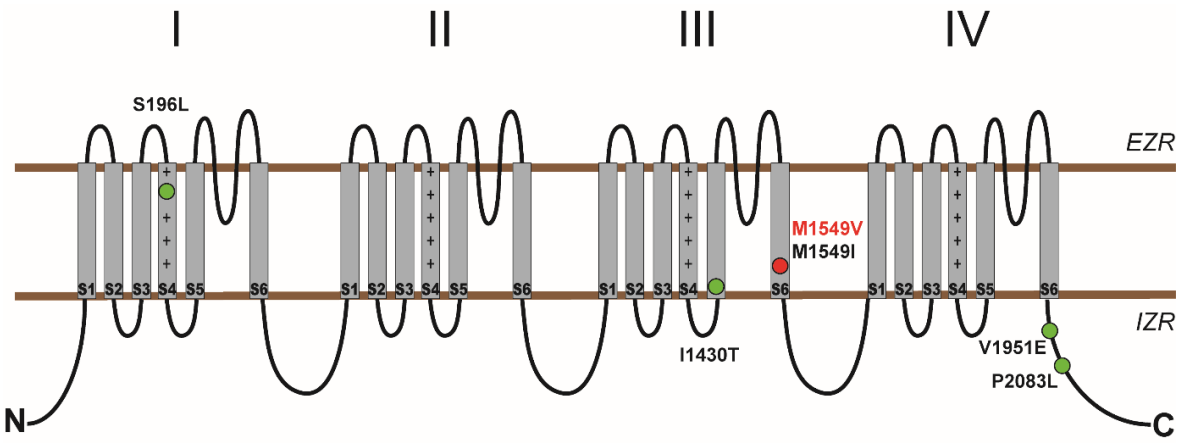


Abbildung 5: ***Schematische Darstellung von CACNA1H.*** *Gezeigt sind die vier homologen Strukturwiederholungen (I – IV) mit den jeweiligen sechs Transmembrandomänen (S1 – S6). Die Länge der Schleifen zwischen den einzelnen Transmembrandomänen entspricht dabei nicht der tatsächlichen Länge dieser Schleifen. Die positiven Ladungen der Aminosäuren in den S4-Domänen sind durch + angedeutet. Die relative Position der bisher im Zusammenhang mit Primärem Hyperaldosteronismus beschriebenen Mutationen (Scholl et al. 2015; Daniil et al. 2016; Nanba et al. 2020) ist durch farbige Kreise markiert. Die zuerst von Scholl et al. gefundene und im Folgenden näher beschriebene Mutation M1549V ist zusätzlich in Rot gekennzeichnet. Weitere Abkürzungen: N: N-Terminus; C: C-Terminus; EZR: Extrazellularraum; IZR: Intrazellularraum*

1.5.3 Die Mutante CACNA1H^{M1549V} – was bisher bekannt ist

Die CACNA1H-Mutation M1549V, deren Pathophysiologie in dieser Arbeit näher untersucht wird, wurde zunächst bei fünf nicht miteinander verwandten Kindern entdeckt, welche bereits vor dem zehnten Lebensjahr Bluthochdruck infolge von Primärem Hyperaldosteronismus entwickelten. Damit war es die erste CACNA1H-Mutation, die im Zusammenhang mit PA gefunden wurde (Scholl et al. 2015). Das Methionin an Position 1549 liegt am Ende der Transmembrandomäne IIIS6 und gehört zu einem Methionin-Phenylalanin-Valin-Motiv, welches einerseits auch in den anderen

beiden T-Typ Calciumkanälen CACNA1G und CACNA1I gefunden werden kann, andererseits auch bei orthologen Kanälen in anderen Spezies konserviert vorliegt (Scholl et al. 2015). Dabei wurde bereits 2001 gezeigt, dass diese Region bei CACNA1G an der Regulation der Kanalfunktion beteiligt ist und die Mutation des Methionins zu Isoleucin zu einer verzögerten Inaktivierung führt (Marksteiner et al. 2001). Die elektrophysiologische Charakterisierung des Kanals in HEK293T-Zellen zeigte, dass die M1549V-Mutation verglichen mit dem Wildtyp zu einer ca. zehnfach langsameren Inaktivierung führt. Weiterhin aktivierte der mutierte Kanal bereits bei niedrigeren Membranpotentialen, auch wenn die Unterschiede nur gering waren (Scholl et al. 2015). Ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften zeigt der Kanal auch mit der M1549I-Mutation, welche 2016 bei einem Jungen mit PA identifiziert wurde (Daniil et al. 2016). Ebenso wurde gezeigt, dass die Überexpression von CACNA1H^{M1549V} auch im Zellmodell zu einer erhöhten Aldosteronproduktion sowie verstärkten CYP11B2-Expression führt. Beide Effekte konnten durch Kalium und Ang II stimuliert werden, waren jedoch durch den T-Typ spezifischen Calciumkanalinhibitor Mibefradil hemmbar (Reimer et al. 2016).

Wie bereits erwähnt, wurden die bisherigen elektrophysiologischen Untersuchungen zu CACNA1H^{M1549V} in nicht-adrenalen Zellen durchgeführt (Scholl et al. 2015). Dabei zeigte der Kanal keine Aktivität im Bereich des Ruhemembranpotentials nativer Glomerulosazellen. Auch waren die Unterschiede in der Spannungsabhängigkeit zwischen Mutante und Wildtyp nur gering. Weiterhin wurden bisher keine Messungen beschrieben, die zeigen, wie die Mutante die Entstehung von Membranpotentialoszillationen oder die intrazelluläre Ca^{2+}-Aktivität beeinflusst. Auch wurde bisher nicht näher untersucht, welche Rolle die teilweise Na^+-Leitfähigkeit von T-Typ Calciumkanälen (Stephens et al. 2015) bei der Physiologie des mutierten Kanals spielt. Es sind also noch einige Fragen offen, um zu klären, auf welche Weise CACNA1H^{M1549V} zu einer autonomen Aldosteronproduktion führt.

1.6 Der pH-Wert der Zelle und seine Rolle bei der Aldosteronsynthese

Neben Ca^{2+} als zentralem Regulator der Aldosteronproduktion zeigen ältere Arbeiten, dass der pH-Wert sowie die Mechanismen zu dessen Regulation ebenfalls Einfluss auf die Aldosteronsynthese haben (Radke et al. 1986; Horiuchi et al. 1989; Conlin et al. 1990). Daneben trägt eine veränderte pH-Homöostase auch zum Phänotyp von APA-assoziierten Mutationen der Na^+/K^+-ATPase bei (Stindl et al. 2015).

Der extrazelluläre pH-Wert liegt unter physiologischen Bedingungen bei ca. 7,3 – 7,4 und ist damit leicht alkalisch. Intrazellulär ist der pH im Zytosol mit 7,2 etwas saurer. Allerdings ist der pH in den einzelnen Organellen nicht einheitlich. So sind Lysosomen mit einem pH von 4,7 deutlich sauer, während Mitochondrien mit pH 8 alkalisch sind (Casey et al. 2010). Da bei vielen Stoffwechselprozessen Protonen frei werden, sind in der Zelle verschiedene Mechanismen nötig, diese aus dem Zytosol zu entfernen, um so einer zu starken Ansäuerung entgegenzuwirken. Die meisten dieser Mechanismen beruhen dabei auf der Kopplung des H^+-Exports an den Transport anderer Ionen. Eine wichtige Rolle dabei spielt der Na^+/H^+-Austauscher (NHE). Dieser transportiert Na^+ entlang seines elektrochemischen Gradienten in die Zelle und exportiert H^+ aus dem Zytosol (Aronson 1985). Im Gegensatz dazu transportieren die Plasmamembran Ca^{2+}-ATPasen (PMCA) für jedes Ca^{2+}-Ion, das sie unter ATP-Verbrauch aus der Zelle transportieren, zwei Protonen in die Zelle (Thomas 2009) und tragen somit zur intrazellulären Ansäuerung bei. Dadurch wird deutlich, dass der intrazelluläre pH-Wert sowohl mit der Na^+- als auch der Ca^{2+}-Homöostase in Zusammenhang steht. Auch die Aktivität des Na^+/Ca^{2+}-Austauschers (NCX) wird durch den pH beeinflusst. Einerseits hemmen Protonen direkt die Aktivität des NCX (Scranton et al. 2020). Andererseits kann eine intrazelluläre Azidose zu einer verstärkten NHE-Aktivität und damit zur Erhöhung der intrazellulären Na^+-Konzentration führen. Übersteigt diese einen bestimmten Wert, kann es zur Umkehr der Transportrichtung des NCX kommen, sodass Ca^{2+} importiert anstatt exportiert wird (Blaustein und Lederer 1999).

Auch die beiden Hauptstimuli der Aldosteronproduktion – Kalium und Ang II – beeinflussen den pH-Wert. Dabei führt Ang II in einer zweiphasigen Reaktion zunächst zur Ansäuerung, nach kurzer Zeit jedoch wird der pH alkalischer (Horiuchi et al. 1989). Es wird vermutet, dass die initiale Ansäuerung eine Folge des H^+-Imports durch die erhöhte PMCA-Aktivität ist. Zur Kompensation der Ansäuerung wird der NHE aktiviert. Zur Alkalinisierung kommt es dann, da Ang II auch direkt über die PKC die NHE-Aktivität reguliert (Conlin et al. 1990; Conlin et al. 1991). Allerdings zeigten die Messungen in den Studien von Conlin et al. keine initiale Ansäuerung durch Ang II, sondern nur eine Alkalinisierung (Conlin et al. 1990; Conlin et al. 1991; Conlin et al. 1993). Dabei wird argumentiert, dass dies auf die Verwendung unterschiedlicher Messmethoden zurückzuführen ist (Conlin et al. 1990). Eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration führt dagegen zu einer stärkeren Ansäuerung der Zellen, welche abhängig von der extrazellulären Calciumkonzentration ist und daher ebenfalls durch die erhöhte Aktivität der PMCA verursacht wird. Gleichzeitig kommt es auch unter Kaliumstimulation durch die Ansäuerung zu einer Aktivierung des NHE (Conlin et al. 1993). Dies zeigt, dass der NHE eine wichtige Rolle bei der pH-Regulation in Glomerulosazellen spielt. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Aktivität des NHE auch Einfluss auf die Aldosteronsynthese

nimmt und eine Inhibition des NHE zu einer Hemmung der kalium- und Ang II-induzierten Aldosteronproduktion führt (Horiuchi et al. 1989; Conlin et al. 1993). Weiterhin wurde berichtet, dass eine extrazelluläre Ansäuerung die Ang II-induzierte Aldosteronproduktion verstärkt. Verantwortlich dafür sind Prozesse, die der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration nachgeschaltet sind. Es ist allerdings unklar, welche Signalwege genau dabei reguliert werden (Kramer et al. 2000).

Allerdings gibt es eine Reihe zellulärer Prozesse, die mit der Aldosteronsynthese in Zusammenhang stehen und die durch Veränderungen des pH-Wertes reguliert werden. So beeinflussen beispielsweise Änderungen des extrazellulären pH die Aktivität von Calciumkanälen. Bei erhöhtem pH nimmt die Aktivität der Kanäle zu, während sie bei saureren Bedingungen abnimmt. Dabei reagieren T-Typ Kanäle deutlich empfindlicher auf Änderungen des extrazellulären pH als L-Typ Kanäle (Tytgat et al. 1990). Im Gegensatz dazu sind L-Typ Kanäle empfindlicher gegenüber Änderungen des intrazellulären pH-Werts. Hierbei kommt es unter alkalischeren Bedingungen ebenfalls zu einer stärkeren Aktivität, während ein niedriger pH auch zu einem geringeren Strom führt. T-Typ Calciumkanäle dagegen sind nahezu unempfindlich gegenüber intrazellulären pH-Veränderungen (Tombaugh und Somjen 1997). Auch die Aktivität der Kaliumkanäle TASK-1 und TASK-3, die in Glomerulosazellen für das negative Ruhemembranpotential verantwortlich sind, ist pH-abhängig. Dabei führt eine extrazelluläre Ansäuerung zu einer Hemmung der Kanäle (Duprat et al. 1997; Czirják und Enyedi 2002). Weiterhin wurde herausgefunden, dass die α-Untereinheiten von G-Proteinen als pH-Sensoren dienen können und dass die Signalweiterleitung durch GPCRs ebenfalls pH-abhängig ist (Isom et al. 2013). Da es sich bei den Angiotensin-Rezeptoren ebenfalls um GPCRs handelt, wäre dies eine Möglichkeit, wie der pH die Aldosteronsynthese beeinflusst. Eine weitere Möglichkeit wäre der WNT/β-Catenin-Signalweg. Wie bereits erwähnt, ist der genaue Mechanismus, wie β-Catenin die Aldosteronproduktion reguliert, nicht bekannt. Dennoch gibt es seltene Fälle von APAs mit CTNNB1-Mutationen (Åkerström et al. 2016; Wu et al. 2017). Es wurde berichtet, dass β-Catenin ebenfalls als pH-Sensor fungieren kann und dass die Stabilität des Proteins mit steigendem pH abnimmt (White et al. 2018). Dennoch ist der genaue Mechanismus, wie der intrazelluläre pH-Wert die Aldosteronproduktion beeinflusst, weiterhin ungeklärt. Dabei könnten die pH-abhängigen Mechanismen grundsätzlich über die intrazelluläre Ca^{2+}-Aktivität – indirekt über das Membranpotential oder durch Regulation der Ca^{2+}-abhängigen Signale – oder über die Aktivierung bzw. Hemmung anderer Signalwege Einfluss nehmen. Außerdem kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass die pH-abhängigen Wege unter pathologischen Bedingungen an Bedeutung gewinnen. Somit könnten sie mögliche neue Ziele für eine Therapie des Primären Hyperaldosteronismus aufzeigen.

1.7 Zielsetzung

T-Typ Calciumkanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Aldosteronsynthese, da sie sowohl unter Kalium- als auch Ang II-Stimulation für die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration verantwortlich sind (Cohen et al. 1988; Lotshaw 2001). Eine besondere Bedeutung kommt dabei dem Kanal CACNA1H zu. Die Mutation $CACNA1H^{M1549V}$ war die erste Mutation eines T-Typ Calciumkanal, die im Zusammenhang mit Primärem Hyperaldosteronismus (PA) gefunden wurde (Scholl et al. 2015). Der mutierte Kanal aktiviert bereits bei niedrigerem Membranpotential und inaktiviert langsamer als der Wildtyp. Derartige Charakterisierungen wurden bislang allerdings ausschließlich in nicht-adrenalen Zelllinien durchgeführt. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung, welche Auswirkung die Mutation M1549V auf die Kanalfunktion im adrenalen Zellmodell hat, um so die Pathophysiologie der Mutation bei der Entstehung von PA besser verstehen zu können. Dazu wurde der Kanal in der adrenalen Zelllinie NCI-H295R überexprimiert und anschließend durch Patch Clamp Experimente elektrophysiologisch charakterisiert. Ebenso wurde der Einfluss der Mutante auf die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration sowie den pH-Wert untersucht.

Ein weiterer Faktor, der die Aldosteronproduktion beeinflusst, ist der intrazelluläre pH-Wert. Allerdings sind die genauen Mechanismen, wie dies geschieht, noch nicht näher bekannt. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, mögliche Signalwege herauszufinden, über die der intrazelluläre pH die Aldosteronsynthese reguliert. Dazu wurden NCI-H295R-Zellen mit Kalium oder Ang II stimuliert und zusätzlich mit Natriumacetat behandelt. Anschließend wurde die Aldosteronproduktion mittels ELISA gemessen sowie die Expression bestimmter an der Steroidhormonbiosynthese beteiligter Gene bestimmt. Um mögliche Mechanismen des pH-Einflusses zu identifizieren, wurden gezielt Signalwege inhibiert, die mit der Aldosteronsynthese im Zusammenhang stehen. Außerdem wurde eine Proteomanalyse durchgeführt, um mögliche neue Signalwege identifizieren zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	VWR, Radnor, PA, USA
Angiotensin II	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
ATP Na2	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
BCECF AM	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Bovine fibronectin	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
$CaCl_2$ x $2H_2O$	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Collagen from calf skin solution	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
CRT0066101	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA
D-Kaliumgluconat	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Dulbecco's PBS	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
DynaBeads CD8	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
EGTA	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Fetal calf serum (FCS)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
Fura-2 AM	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gö-6983	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HEPES	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
K_2HPO_4	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
KCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

KH_2PO_4 x $3H_2O$	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
KN93	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
$MgCl_2$ x $6H_2O$	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mibefradil	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA
MIDORI Green Xtra	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland
Milchpulver, fettarm	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdesoxycholat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsufat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na_2HPO_4	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
NaH_2PO_4	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaN_3	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat (NaAc)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
N-Methyl-D-glucamin (NMDG)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Penicillin-Streptomycin	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
PowerLoad 100x	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TAE Puffer, 50x	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA-Lösung (10x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tween-20	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA

2.1.2 Enzyme und Kits

Aldosteron-ELISA	IBL International GmbH, Hamburg, Deutschland
Bradford-basierter Protein-Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
dNTP-Mix	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Immobilon Forte Western HRP Substrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
4x Laemmli-Probenpuffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
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, Deutschland
Phosphataseinhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Proteaseinhibitor-Cocktail	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Random Hexamer Primers	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNasin® Ribonucleaseinhibitor	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Takyon™ SYPR 2X MasterMix	Eurogentec, Lüttich, Belgien

2.1.3 Oligonukleotide

Zielgen	NCBI RefSeq Nummer	Primersequenz		Amplikon-größe [bp]	T_A [°C]
ACTB	NM_001101.3	se	CCAACCGCGAGAAGATGA	97	57
		as	CCAGAGGCGTACAGGGATAG		
CYP11B2	NM_000498.3	se	CACCACGTGCTGAAGCACT	139	63
		as	CCTGGGTGCAGATGCAAGAC		
CYP21A2	NM_000500.5	se	TCATCATTCCGAACCTCCA	87	59
		as	GCTCCAGGAAGCGATCAG		
HSD3B2	NM_000198.3	se	CTTGGACAAGGCCTTCAGAC	78	60
		as	TCAAGTACAGTCAGCTT-GGTCCT		
NR4A2	NM_006186.3	se	AACTCCTAAGGAGGAGATTG	92	57
		as	GACAGTGTCGTAATTCAATG		
STAR	NM_000349.2	se	GAGAGTCAGCAGGACAATGG	67	60
		as	GGAACACCTTGCCCACATC		

Zielgen	NCBI RefSeq Nummer	Primersequenz		Amplikon-größe [bp]	T_A [°C]
CTTNBP2NL	NM_018704.3	se	CTGCCGATTATCAGGCTTTC	129	57
		as	GTTGGGCCTTTAAGGCTTC		
CIP2A	NM_020890.3	se	TACTTCAGGACCCACGTTTG	79	57
		as	AGTCCAGACTGTACTTGTTCTC		
KCNJ5	NM_000890.3	se	GAGTTTGAAGTTGTGGTCATTC	123	57
		as	GGTGAGGACTGGTGTGAATC		
GK	NM_203391.4	se	TGCAGGTAGATGGAGGAATG	90	57
		as	CATTGAGGGCTTCACTACT		
APOO	NM_024122.5	se	GGTTGATGAGCTTTCACTCTAC	94	57
		as	GAGCTGTGAGATGCTTTCTTC		

In der Spalte T_A ist die Temperatur angegeben, die bei den jeweiligen Primern zur Anlagerung verwendet wurde. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) synthetisiert.

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
Apolipoprotein O (APOO)	*Mouse*	1:2.000	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
β-Actin	*Mouse*	1:4.000	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Cancerous inhibitor of PP2A (CIP2A)	*Rabbit*	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Aldosteronsynthase (CYP11B2)	*Mouse*	1:1.000	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA (Gomez-Sanchez et al. 2014)
21-Hydroxylase (CYP21A2)	*Rabbit*	1:1.000	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Glycerolkinase (GK)	*Rabbit*	1:1.000	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
G protein-activated inward rectifier potassium channel 4 (KCNJ5)	*Rabbit*	1:500	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
Protein Phosphatase 2, katalytische Untereinheit (PPP2CA)	*Mouse*	1:2.000	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)	*Rabbit*	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA

2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma
Donkey-anti-mouse, HRP-konjugiert	1:5.000 1:20.000 (für β-Actin)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Goat-anti-rabbit, HRP-konjugiert	1:5.000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA

2.1.5 Lösungen und Puffer

2.1.5.1 Lösungen für Patch Clamp Experimente und Live Cell Imaging

Lösung	Substanz	mmol/l
1x Ringer-Kontrolllösung	HEPES	5
	NaCl	145
	KH_2PO_4	0,4
	K_2HPO_4	1,6
	$MgCl_2$	1
	$CaCl_2$	1,3
	Glucose	5
	pH 7,4 (eingestellt mit NaOH oder HCl)	

Lösung	Substanz	mmol/l
4,5 mM K^+-Lösung	HEPES	5
	NaCl	144,1
	KH_2PO_4	0,4
	K_2HPO_4	1,6
	$MgCl_2$	1
	$CaCl_2$	1,3
	KCl	0,9
	Glucose	5
	pH 7,4 (eingestellt mit NaOH oder HCl)	
6 mM K^+-Lösung	HEPES	5
	NaCl	142,6
	KH_2PO_4	0,4
	K_2HPO_4	1,6
	$MgCl_2$	1
	$CaCl_2$	1,3
	KCl	2,4
	Glucose	5
	pH 7,4 (eingestellt mit NaOH oder HCl)	
7,5 mM K^+-Lösung	HEPES	5
	NaCl	141,1
	KH_2PO_4	0,4
	K_2HPO_4	1,6
	$MgCl_2$	1
	$CaCl_2$	1,3
	KCl	3,9
	Glucose	5
	pH 7,4 (eingestellt mit NaOH oder HCl)	

Lösung	Substanz	mmol/l
10 mM K^+-Lösung	HEPES	5
	NaCl	138,6
	KH_2PO_4	0,4
	K_2HPO_4	1,6
	$MgCl_2$	1
	$CaCl_2$	1,3
	KCl	6,4
	Glucose	5
	pH 7,4 (eingestellt mit NaOH oder HCl)	
12,5 mM K^+-Lösung	HEPES	5
	NaCl	136,1
	KH_2PO_4	0,4
	K_2HPO_4	1,6
	$MgCl_2$	1
	$CaCl_2$	1,3
	KCl	8,9
	Glucose	5
	pH 7,4 (eingestellt mit NaOH oder HCl)	
15 mM K^+-Lösung	HEPES	5
	NaCl	133,6
	KH_2PO_4	0,4
	K_2HPO_4	1,6
	$MgCl_2$	1
	$CaCl_2$	1,3
	KCl	11,4
	Glucose	5
	pH 7,4 (eingestellt mit NaOH oder HCl)	

Lösung	Substanz	mmol/l
Na^+-freie Lösung	HEPES	5
	NMDG	145
	KH_2PO_4	0,4
	K_2HPO_4	1,6
	$MgCl_2$	1
	$CaCl_2$	1,3
	Glucose	5
	HCl	145
	pH 7,4 (eingestellt mit HCl oder NMDG)	
Ca^{2+}-freie Lösung	HEPES	5
	NaCl	146,95
	KH_2PO_4	0,4
	K_2HPO_4	1,6
	$MgCl_2$	1
	Glucose	5
	pH 7,4 (eingestellt mit NaOH oder HCl)	
Na^+/Ca^{2+}-freie Lösung	HEPES	5
	NMDG	146,95
	KH_2PO_4	0,4
	K_2HPO_4	1,6
	$MgCl_2$	1
	Glucose	5
	HCl	146,95
	pH 7,4 (eingestellt mit HCl oder NMDG)	

Lösung	Substanz	mmol/l
20 mM NaAc-Lösung	HEPES	5
	NaCl	125
	KH_2PO_4	0,4
	K_2HPO_4	1,6
	$MgCl_2$	1
	$CaCl_2$	1,3
	Natriumacetat (NaAc)	20
	Glucose	5
	pH 7,4 (eingestellt mit NaOH oder HCl)	
Pipettenlösung	K^+-Gluconat	95
	KCl	30
	NaH_2PO_4	1,2
	Na_2HPO_4	4,8
	Glucose	5
	$MgCl_2$	2,38
	$CaCl_2$	0,73
	EGTA	1
	ATP Na_2	3
	pH 7,2 (eingestellt mit KOH oder HCl)	

2.1.5.2 Lösungen für Proteinisolation und Western Blot

Lösung	Substanz	Endkonzentration
PBS-Puffer, pH 7,4	KH_2PO_4	1,8 mM
	Na_2HPO_4	10,3 mM
	NaCl	137 mM
		in MilliQ-H_2O dest.

Lösung	Substanz	Endkonzentration
RIPA-Lysepuffer	SDS	0,1 %
	Natriumdesoxycholat	0,5 %
	IGEPAL CA-630	1 %
	Proteaseinhibitor-Cocktail	1 %
	PMSF	1 mM
	Phosphataseinhibitor	1 Tablette/10 ml
		in PBS, pH 7,4
SDS-PAGE Trenngel	Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	10 %
	1,5 M Tris (pH 8,8)	375 mM
	SDS	0,1 %
	Ammoniumpersulfat	0,1 %
	TEMED	0,04 %
		in MilliQ-H_2O
SDS-PAGE Sammelgel	Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	5 %
	0,5 M Tris (pH 6,8)	62,5 mM
	SDS	0,1 %
	Ammoniumpersulfat	0,1 %
	TEMED	0,1 %
		in MilliQ-H_2O
SDS-PAGE Laufpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 %
		in MilliQ-H_2O
Transferpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 %
		in MilliQ-H_2O
TBS 10x	Tris	0,5 M
	NaCl	1,5 M
		in MilliQ-H_2O
		pH 7,6 (eingestellt mit HCl)

Lösung	Substanz	Endkonzentration
TBS-T 1x	TBS 10x	100 ml
	Tween-20	1 ml
		ad 1 l mit MilliQ-H_2O
Blocklösung	Milchpulver, fettarm	5 %
		in TBS-T
Antikörperverdünnungslösung (primärer Antikörper)	Milchpulver, fettarm	2,5 %
	NaN_3	0,02%
		in TBS-T
Antikörperverdünnungslösung (sekundärer Antikörper)	Milchpulver, fettarm	1 %
		in TBS-T
Mild stripping buffer	Glycin	200 mM
	SDS	0,1 %
	Tween-20	1 %
		in MilliQ-H_2O
		pH 2,2 (eingestellt mit HCl)

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

96-well PCR-Platte	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
Adhesive sealing film	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
Falcon Zellkulturschale 35 mm	Corning Inc., Corning, NY, USA
Filterspitzen	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
Glasplättchen 25 mm	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Microtiterplatten	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Patch-Glaskapillaren	Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
Serologische Pipetten	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
Sterilfilter	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.1.7 Geräte

Autoklav	Tuttnauer, Breda, Niederlande
Axiocam Mrm	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Axiovert 10 Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Benchmark Microplate-Reader	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Branson Ultraschallbad	Emerson Electric Company, St. Louis, MO, USA
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
ChemiDoc Imaging system	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
DMZ Universal Puller	Zeitz Instruments GmbH, Martinsried, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Examiner A1	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	VWR, Radnor, PA, USA
inoLab® pH/ION 7320	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland
Lambda DG-4 illumination system	Sutter Instruments, Novato, CA, USA
Light Cycler LC480	Roche, Basel, Schweiz
Multi Channel Perfusionssystem	Scientifica Ltd, Uckfield, Vereinigtes Königreich
NanoDrop™ 3300	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Neon® Transfection System	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PatchStar Micromanipulator	Scientifica Ltd, Uckfield, Vereinigtes Königreich
Peristaltic perfusion system PPS2	Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Deutschland
PowerPac™ Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
PROTEAN Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
SUNRISE Plattenphotometer	Tecan, Männedorf, Schweiz
Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Verstärker EPC-10	HEKA, Lambrecht, Deutschland
Wet Blot-Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

2.1.8 Software

Axiovision	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
FitMaster v2x90.5	HEKA, Lambrecht, Deutschland
GraphPad Prism	GraphPad, San Diego, CA, USA
Image Studio Lite Ver 5.2	LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE, USA
LabChartPro v7	ADInstruments GmbH, Spechbach, Deutschland
LightCycler 480 Software	Roche, Basel, Schweiz
LinLab	Scientifica Ltd, Uckfield, Vereinigtes Königreich
PatchMaster v2x50	HEKA, Lambrecht, Deutschland

2.2 Methoden zur Untersuchung der Pathophysiologie von CACNA1H^{M1549V}

2.2.1 Plasmide und Konstrukte

Die zur Expression von Wildtyp- und mutiertem CACNA1H verwendeten Plasmide wurden bereits vor Beginn der Arbeit von Dr. Julia Stindl kloniert (Gürtler et al. 2020). Die finalen bicistonischen pIRES-CD8 Vektoren enthielten neben der codierenden Sequenz von CACNA1H auch das Gen für humanes CD8, das durch eine IRES-Kassette vom Zielgen getrennt ist (Plasmidkarten vgl. 6.1). Das membranständige CD8 wird unabhängig vom Zielgen exprimiert und dient so als Transfektionskontrolle. Dazu wurden transfizierte Zellen mit anti-CD8-gekoppelten DynaBeads markiert und konnten so unter dem Lichtmikroskop von nicht transfizierten Zellen unterschieden werden.

2.2.2 Zellkultur und Transfektion

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C und humider Atmosphäre von 5% CO_2 kultiviert. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz herangezogen und für die entsprechenden Versuche gesplittet. Dabei erfolgte die Kultur für Patch Clamp Experimente auf Fibronektin/Kollagen-beschichteten Glasplättchen. Für intrazelluläre Ca^{2+}- und pH-Messungen wurden die Zellen in Falcon-Zellkulturschälchen mit 3,5 cm Durchmesser (Corning Inc., Corning, NY, USA) kultiviert. Alle Zellkulturreagenzien und Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) bezogen.

Als adrenales Zellmodell diente die aus einem Nebennierenkarzinom stammende Zelllinie NCI-H295R (CLS, Eppelheim, Deutschland) (Gazdar et al. 1990). Die Kultivierung erfolgte in einem zelllinienspezifischen DMEM/F12 Medium (mit 15 mM HEPES; 1,25 mg/ml BSA; 6,25 µg/ml Insulin; 6,25 µg/ml Transferrin; 6,25 µg/ml Selen; 5,35 mg/ml Linolensäure; 2,5 % Nu-Serum; CLS, Eppelheim, Deutschland), supplementiert mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Wird im Folgenden die Bezeichnung „NCI-Zellen" verwendet, so ist dies gleichbedeutend mit NCI-H295R-Zellen. Weiterhin verwendet wurden Zellen der Zelllinie CHO (*Chinese hamster ovary;* CLS, Eppelheim, Deutschland), welche in MEM-alpha mit 10 % FCS, supplementiert mit 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin, kultiviert wurden.

NCI-Zellen (2×10^6) wurden 24 h bzw. 48 h vor Versuchsbeginn mit 5 µg pIRES-CD8/CACNA1H^{WT} oder pIRES-CD8/CACNA1H^{M1549V} oder mit 3 µg leerem pIRES-CD8-Vektor unter Verwendung des NEON® Elektroporationssystems transfiziert. Die Elektroporation erfolgte nach Herstellerangaben mit einem auf NCI-Zellen optimierten Pulsprotokoll (1 Puls, 40 ms bei 1.100 V). CHO-Zellen (5×10^5) wurden 24 h vor Versuchsbeginn analog zu den NCI-Zellen transfiziert, jedoch wurden hier zur Elektroporation 2 Pulse von 20 ms bei 1.400 V verwendet. Die transfizierten Zellen wurden anschließend bis Versuchsbeginn im jeweiligen Kulturmedium ohne Zusatz von Antibiotika kultiviert.

2.2.3 Patch Clamp Experimente

Elektrophysiologische Ganzzellmessungen wurden bei Raumtemperatur (RT) oder 37°C und unter konstanter Perfusion an transfizierten NCI- und CHO-Zellen unter Verwendung eines EPC-10 Verstärkers (HEKA, Lambrecht, Deutschland) durchgeführt. Die Datenerfassung erfolgte mithilfe eines PowerLab Data Acquisition Systems (ADInstruments GmbH, Spechbach, Deutschland) und der entsprechenden Software LabChartPro v7. Zur Pulsgenerierung wurde die PatchMaster v2x50 Software (HEKA, Lambrecht, Deutschland) verwendet. Patch-Pipetten aus Borosilikat-Kapillaren (mit Filament) wurden mit dem DMZ Universal Puller (Zeitz Instruments GmbH, Martinsried, Deutschland) gezogen und poliert und hatten einen Widerstand zwischen 5 MΩ und 10 MΩ. Transfizierte Zellen wurden durch anti-CD8-gekoppelte DynaBeads markiert.

Das Ruhemembranpotential (V_m) wurde direkt nach dem Einreißen der Zellmembran in Kontrolllösung gemessen. Dies erfolgte im CC0-Modus (*current clamp*-Modus), bei dem das Membranpotential gemessen wird, wenn kein Strom über die Zellmembran fließt. Die Messung spannungsabhängiger Ca^{2+}-Ströme in Zellen, die mit Wildtyp- oder mutiertem CACNA1H transfiziert waren, erfolgte im Vc-Modus (*voltage clamp*-Modus), bei dem der Strom gemessen wird, wenn das

Membranpotential auf bestimmten Spannungen gehalten wird. Dazu verwendet wurde ein Klemmprotokoll, bei dem das Membranpotential der Zellen in 5 mV Schritten von -90 mV auf -20 mV erhöht wurde, wobei die Zellen nach jeder Stufe zunächst zurück auf ein Haltepotential von -100 mV geklemmt wurden. Für die Darstellung der Spannungsabhängigkeit des CACNA1H-abhängigen Einwärtsstroms wurde folgendermaßen vorgegangen: Zunächst wurde das Maximum des Einwärtsstroms zu jedem Spannungsklemmschritt bestimmt und dieser Wert dann jeweils auf den maximalen Einwärtsstrom der gesamten Klemmreihe normalisiert. Mit doppelt exponentiellen Fits der Stromtraces wurde anhand der Zeitkonstanten (tau) die Kinetik von Aktivierung und Inaktivierung des Einwärtsstroms als Funktion des Potentials untersucht. Zur Analyse der Daten wurde die Software FitMaster v2x90.5 (HEKA, Lambrecht, Deutschland) verwendet. Weiterhin wurde die Entstehung von Membranpotentialoszillationen untersucht, die in nativen Glomerulosazellen nur nahe des normalen Ruhemembranpotentials von -80 mV auftreten (Hu et al. 2012). Da das basale Membranpotential der meisten mit Wildtyp- oder mutiertem CACNA1H transfizierten NCI-Zellen jedoch depolarisierter war, wurden die Zellen im *current clamp*-Modus durch Injektion konstanter negativer Ströme (zwischen -3 und -15 pA) auf ein Membranpotential von ca. -80 mV hyperpolarisiert. Dabei wurden spontane Änderungen der Membranspannung (V_{mc}) gemessen.

2.2.4 Intrazelluläre Ca^{2+}-Messungen

Zur Messung der intrazellulären Ca^{2+}-Aktivität wurde der ratiometrische Ca^{2+}-sensitive Fluoreszenzindikator Fura-2 verwendet. Zunächst wurden transfizierte NCI-Zellen mit anti-CD8-gekoppelten DynaBeads, welche in Kontrolllösung verdünnt waren, markiert. Danach wurden die Zellen im Dunkeln mit 2 µM Fura-2 Acetoxymethylester (Fura-2 AM), in Kontrolllösung gemeinsam mit 1X PowerLoad verdünnt, für 60 min. bei Raumtemperatur beladen. Anschließend wurden die Zellen mit Kontrolllösung gewaschen, in die Messkammer eingespannt und im Mikroskop platziert. Die Badlösung, mit der die Messkammer während des gesamten Experiments umspült wurde, hatte standardmäßig eine Temperatur von 37°C. Zu Vergleichszwecken wurden zusätzlich auch Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Steuerung des Perfusionssystems erfolgte mithilfe der LinLab Software (Scientifica Ltd, Uckfield, Vereinigtes Königreich), wodurch auch ein automatischer Wechsel zwischen verschiedenen Lösungen ermöglicht wurde.

Die Belichtung der mit Fura-2 beladenen Zellen mit abwechselnd 340 nm und 380 nm erfolgte alle 5 Sekunden über ein Lambda DG-4 System (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Die Emission einzelner Zellen wurde bei 510 nm aufgezeichnet. Die Fluoreszenzintensität von Fura-2 nimmt bei steigender Ca^{2+}-Konzentration nach Anregung mit 340 nm zu und fällt gleichzeitig nach Anregung

mit 380 nm ab. Bei sinkenden Ca^{2+}-Konzentrationen verhält es sich entsprechend umgekehrt. Die Ratio der Emissionsintensitäten nach Anregung mit 340 nm und 380 nm dient als relatives Maß für die intrazelluläre Ca^{2+}-Aktivität. Die Messungen wurden an einem aufrechten Mikroskop (Zeiss Examiner A1) mit 40X Wasserimmersionsobjektiv (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) aufgenommen, welches mit einer Axiocam Mrm Kamera (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) verbunden war. Zur Steuerung und Überwachung der Experimente, sowie zur Berechnung der Ratio für einzelne Zellen nach Abzug des Hintergrundsignals wurde die Axiovision-Software (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) verwendet. Zur Definition des Hintergrundsignals wurde das Signal in einem Bereich ohne Zellen bestimmt.

Anstelle von mit dem leeren Vektor pIRES-CD8 transfizierten Zellen wurden bei einigen Experimenten als interne Kontrolle untransfizierte Zellen ohne DynaBeads aus den jeweiligen Schalen mit Wildtyp- oder mutiertem CACNA1H-exprimierenden Zellen verwendet.

2.2.5 Intrazelluläre pH-Messungen

Relative Änderungen des intrazellulären pH-Werts wurde mit dem ratiometrischen pH-Indikator BCECF gemessen. Die Messungen erfolgten mit den BCECF-spezifischen Filtern am selben Setup, an dem auch die Ca^{2+}-Messungen durchgeführt wurden (vgl. 2.2.4).

Die Markierung transfizierter NCI-Zellen erfolgte mit anti-CD8-gekoppelten DynaBeads, welche in Kontrolllösung verdünnt waren. Die Beladung der Zellen mit 1 µM BCECF Acetoxymethylester (BCECF AM), verdünnt in Kontrolllösung, erfolgte für 60 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Messungen selbst wurden bei 37°C und konstanter Perfusion durchgeführt. Dabei wurde der Farbstoff alle 5 Sekunden abwechseln mit 495 nm und 440 nm belichtet und die Emission bei 535 nm gemessen. Die Fluoreszenzintensität von BCECF steigt nach Anregung mit 495 nm bei steigendem pH-Wert an (und fällt entsprechend bei sinkendem pH), während sie nach Anregung mit 440 nm unabhängig vom pH-Wert konstant ist. Als relatives Maß für den intrazellulären pH-Wert diente die Ratio der Emissionsintensitäten nach Anregung mit 495 nm und 440 nm. Sie wurde mithilfe der Axiovision-Software für einzelne Zellen nach Abzug des Hintergrundsignals berechnet. Zur Definition des Hintergrundsignals wurde das Signal in einem Bereich ohne Zellen bestimmt. Bei der Auswertung wurden alle Werte der transfizierten Zellen auf den Mittelwert der untransfizierten Zellen derselben Schale zu Beginn des Experiments normalisiert.

2.2.6 Statistik

Die in den einzelnen Abbildungen angegebene Zahl an Experimenten bezieht sich auf die Anzahl der untersuchten Zellen (Patch Clamp) oder Schalen (Ca^{2+}- und pH-Messungen), die zur Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) oder Medianen verwendet wurden. Die Messungen wurden an verschiedenen Tagen mit Zellen unterschiedlicher Passage durchgeführt. Die Daten wurden in der GraphPad Prism-Software (GraphPad, San Diego, CA) unter Verwendung der entsprechenden statistischen Tests analysiert. Der ungepaarte zweiseitige Student‘s t-Test oder der Mann-Whitney-Test wurde verwendet, um das Signifikanzniveau für Vergleiche zweier Gruppen zu berechnen. *One-way* ANOVA mit Tukey-Post-Test wurde für Vergleiche von einer Variablen in mehr als zwei Gruppen verwendet. *Two-way* ANOVA mit Bonferroni-Post-Test wurde verwendet, um das Signifikanzniveau für Mehrfachvergleiche von mehr als einer Variablen zu berechnen. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden ab einem p-Wert $< 0,05$ als signifikant angesehen.

2.3 Methoden zur Untersuchung des Einflusses des zellulären pH auf die Aldosteronproduktion

2.3.1 Zellkultur und Stimulation

Für die Versuche zur Untersuchung des Einflusses des zellulären pH auf die Aldosteronproduktion wurden ausschließlich Zellen der Zelllinie NCI-H295R („NCI-Zellen“) verwendet. Dabei erfolgte die Kultivierung der Zellen wie unter 2.2.2 beschrieben. Für diese Versuche wurden 2×10^6 Zellen nach dem Splitten in 12-*well*-Platten ausgesät und zunächst für 24 h inkubiert, bis die Zellen wieder adhärent waren. Dann wurden die Zellen dem jeweiligen Versuch entsprechend stimuliert und weitere 24 h kultiviert, ehe die Aufarbeitung erfolgte.

Zur Stimulation wurden konzentrierte Stammlösungen verwendet. KCl, NaCl und NaAc waren dabei in steril filtriertem MilliQ-H_2O gelöst, Ang II und die Inhibitoren Mibefradil, KN93, Gö-6983 und CRT0066101 wurden in DMSO gelöst.

Wurden die Zellen mit einer erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration stimuliert, wurde der Differenzbetrag aus gewünschter Konzentration und der Grundkaliumkonzentration des Zellkulturmediums (4,18 mM) berechnet und dem Medium die entsprechende Menge KCl zugegeben.

Die Wirkungsweise von NaAc beruht darauf, dass das Acetat-Ion und die Essigsäure im Gleichgewicht stehen und Essigsäure membranpermeabel ist. Intrazellulär kommt es zur Dissoziation der Essigsäure, wodurch das extrazellulär aufgenommene Proton im Zytosol freigesetzt wird. Dies führt zu einer intrazellulären Protonenbeladung (vgl. Abbildung 6).

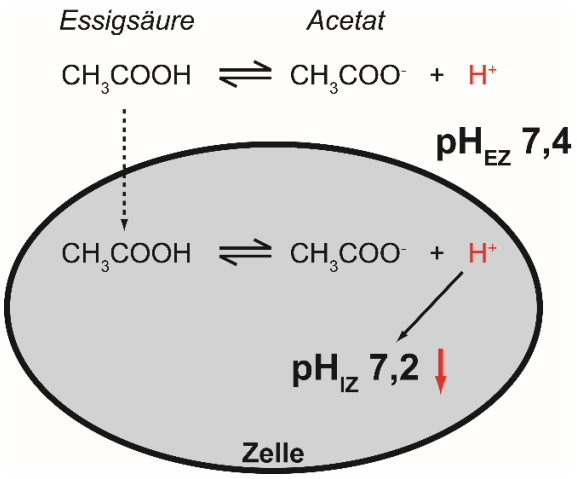


Abbildung 6: ***Wirkungsweise von NaAc zur intrazellulären Protonenbeladung.*** *Acetat steht im Gleichgewicht mit Essigsäure, welche membranpermeabel ist. Dadurch werden extrazellulär (EZ) aufgenommene Protonen in die Zelle transportiert und dort durch Dissoziation der Essigsäure wieder abgegeben. Dadurch kommt es zur intrazellulären (IZ) Protonenbeladung.*

2.3.2 Aldosteron-ELISA und Proteinisolation

Zur Bestimmung der Aldosteronproduktion wurde ein spezifischer Aldosteron-ELISA (IBL International GmbH, Hamburg, Deutschland) verwendet. Zunächst wurden NCI-Zellen dem jeweiligen Versuch entsprechend stimuliert. Nach 24 h wurde das Kulturmedium abgenommen. Normales Zellkulturmedium ohne Zellen wurde zur Bestimmung des Leerwerts verwendet. Die Proben wurden 10 min. bei 11.000 x g zentrifugiert, der Überstand anschließend abgenommen und bei -20°C bis zur Weiterverwendung gelagert. Die Bestimmung der Aldosteronmenge in den Überständen erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei nur drei anstelle von fünf Waschschritten durchgeführt wurden.

Die Zellen wurden zunächst mit Ringerlösung gewaschen und anschließend in 200 µl RIPA-Lysepuffer aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen insgesamt 15 min. auf Eis inkubiert, wobei sie nach 5 und nach 10 min. jeweils für 60 Sekunden im Ultraschallbad sonifiziert wurden. Das Zelllysat wurde in ein Eppendorfcup überführt und 10 min. bei 11.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) photometrisch bei 595 nm. Die Proteinlysate wurden bei -20°C gelagert.

Die im ELISA ermittelte Aldosteronkonzentration wurde auf die Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Probe normalisiert.

2.3.3 RNA-Isolation und quantitative *real-time* PCR

2.3.3.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus Lysaten von NCI-Zellen wurde das NucleoSpin® RNA-Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) verwendet. Die Isolation erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll. Lediglich die Elution erfolgte in 40 µl (anstatt 60 µl) RNase-freiem H_2O. Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch am NanoDrop 3300 bestimmt und die Integrität der RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese (1% Agarose) überprüft. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Für die Synthese von cDNA wurde 1 µg RNA verwendet. Das entsprechende Volumen wurde mit 1 µl Random Hexamer Primer versetzt und mit nucleasefreiem Wasser auf 15 µl Volumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde zunächst 5 min. bei 70°C erhitzt und danach auf Eis wieder abgekühlt. Anschließend wurde der Ansatz mit 5 µl 5x M-MLV Reaktionspuffer, 0,5 mM dNTPs, 40 U RNasin® Ribonucleaseinhibitor und 200 U M-MLV Reverse Transkriptase versetzt und mit nucleasefreiem Wasser auf 25 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Um zu überprüfen, ob die RNA mit genomischer DNA kontaminiert ist, wurde von jeder Probe zusätzlich ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (-RT) erstellt. Alle Ansätze wurden anschließend für 10 min. bei 20°C, 50 min. bei 50°C und 15 min. bei 70°C inkubiert. Die cDNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.3.3.2 Quantitative real-time *PCR*

Mittels quantitativer *real-time* PCR (qPCR) wurde die Expression verschiedener Gene untersucht. Der dazu verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zeigt an doppelsträngige DNA gebunden eine etwa tausendfach stärkere Fluoreszenzintensität als ungebunden. Dadurch ist die Intensität der Emission des Farbstoffs proportional zur DNA-Konzentration der Proben.

Die für die qPCR verwendeten Primer (vgl. 2.1.3) waren alle so designt, dass sie entweder *intron spanning* oder *intron flanking* waren. Alle Primer wurden in nucleasefreiem Wasser resuspendiert. Für die qPCR wurde der Takyon™ SYBR 2X MasterMix (Eurogentec, Lüttich, Belgien) verwendet, der u.a. dNTPs, SYBR Green und DNA-Polymerase enthält. Die Reaktion wurde mit einem Gesamt-

volumen von 10 µl durchgeführt. Neben dem Mastermix enthielten die Ansätze noch 1 µl cDNA sowie jeweils 0,5 µM des *sense*- und *antisense*-Primers. Das fehlende Volumen wurde mit nuclease-freiem Wasser aufgefüllt. Die qPCR-Läufe wurden im Light Cycler LC480 (Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt. Das entsprechende PCR-Programm ist in Tabelle 1 dargestellt. Um die Spezifität der Primer zu überprüfen, wurde am Ende des PCR-Laufs eine Schmelzkurvenanalyse sowie eine Agarose-Gelelektrophorese des PCR-Produktes durchgeführt.

Tabelle 1: qPCR-Programm

Schritt	**Temperatur**	**Dauer**	
Enzymaktivierung	95°C	3 min.	
Denaturierung	95°C	15 s	
Primeranlagerung	57 – 63°C	20 s	40 – 45 Zyklen
Elongation	72°C	20 s	
Schmelzkurvenanalyse	56 – 95 °C	0,11°C/s	

Die jeweilige Temperatur, bei der die Primeranlagerung stattfand, ist unter 2.1.3 in der Spalte T_A aufgeführt. Mit dem CYP11B2-Primern wurde ein verkürztes Protokoll durchgeführt, bei dem die Zeiten von Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation jeweils 5 Sekunden kürzer waren.

Die Auswertung der Messungen erfolgte mithilfe der LightCycler 480 Software. Zur Analyse der Daten wurde der sog. C_p-Wert verwendet. Dieser Wert bezeichnet die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenzintensität einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Dieser Schwellenwert wird von der Software automatisch berechnet. Dabei ist der C_p-Wert umso niedriger, je mehr cDNA des jeweiligen Gens zu Beginn vorhanden war. Zur Quantifizierung wurde die Expression des Zielgens relativ zur Expression des Referenzgens ACTB (β-Actin) unter Berücksichtigung der jeweiligen Reaktionseffizienz berechnet. Zur Berechnung der Effizienz wurden die C_p-Werte einer Verdünnungsreihe des Standards verwendet. Der Standard wiederum bestand aus einem Gemisch aller in der jeweiligen qPCR verwendeten cDNAs.

2.3.4 Proteomanalyse

Durch eine Proteomanalyse sollte untersucht werden, welche Proteine in ihrer Expression durch eine Behandlung mit NaAc beeinflusst werden. Dazu wurden NCI-Zellen zunächst für 24 h stimuliert. Anschließend wurde Kulturmedium abgenommen und die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit Dulbecco's PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Überschüssiges PBS wurde möglichst vollständig

entfernt und das Zellpellet bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert. Im abgenommenen Medium wurde Aldosteron mittels ELISA bestimmt, um zu überprüfen, ob die Stimulation erfolgreich war.

Die eigentliche Proteomanalyse wurde am Institut für funktionelle Genomik von Frau Dr. Katharina Limm durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Anschließend wurden die Proben für die weitere Analyse nach dem sog. „sp3"-Protokoll (*single-pot solid-phase-enhanced sample preparation*, abgewandelt nach (Müller et al. 2020)) präpariert. Die Messung der Proben mittels mikro-LC/MS erfolgte in zwei unterschiedlichen Modi: Einmal in einer Daten-abhängigen Messung (DDA) zur Generierung einer Peptid-Bibliothek und einmal in einer Lable-freien Daten-unabhängigen Quantifizierung (DIA). Hierzu verwendet wurde die Eksigent nanoLC400 (Sciex, Framingham, MA, USA) gekoppelt mit einem Hybrid-Quadrupol-TOF Massenspektrometer (TTOF5600+, Sciex, Framingham, MA, USA). Für die Generierung der Peptid-Bibliothek wurde für jede Behandlung eine aus den einzelnen Ansätzen gepoolte Probe generiert, bei der Daten-unabhängigen Messmethode wurde jede Probe einzeln gemessen. Die Prozessierung der DDA-Läufe wurde mit der ProteinPilot™ Software (Sciex, Framingham, MA, USA) durchgeführt. Die Analyse ergab 31.634 verschiedene Peptide, welche 3763 Proteingruppen zugeordnet werden konnten. Diese Peptid-Bibliothek wurde dann für die Analyse der DIA-Läufe herangezogen. Die hierzu verwendete Software PeakView™+MikroApp 2.2 (Sciex, Framingham, MA, USA) ermöglichte so die Quantifizierung von über 3.400 Proteinen. Modifizierte Peptide oder Peptide, welche mehreren Proteinen zugeordnet werden konnten, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Werte der Peptide (a*rea under the curve*) wurden zu den jeweiligen Proteinen aufsummiert.

Die Proteindaten wurden dann auf „Gesamtintensität" aller Proteine einer Probe normiert. Mit diesen Werten wurden dann die weiteren Auswertungen durchgeführt. Dabei wurden zunächst alle Werte auf den Kontrollwert des jeweiligen Ansatzes normalisiert und anschließend Mittelwerte und SEM dieser normalisierten Werte für alle Ansätze gebildet. Zum Vergleich der einzelnen Behandlungen wurden diese Mittelwerte miteinander verglichen.

2.3.5 Western Blot

2.3.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Isolation von Gesamtprotein aus NCI-Zellen erfolgte, wie unter 2.3.2 beschrieben. Die Proteinlysate wurden unter denaturierenden Bedingungen durch SDS-PAGE nach Größe aufgetrennt. Dazu wurden Polyacrylamidgele benutzt, die aus 5 %igem Sammelgel und 10 %igem Trenngel bestanden. Von jeder Probe wurden 30 µg Protein am Vortag mit 4x Laemmli-Probenpuffer (+50 mM DTT) vermischt und mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Die Proben wurden über Nacht bei -20°C gelagert und am nächsten Tag für 10 min. bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in Laufpuffer bei zunächst 80 V, bis sich die Proben an der Grenzfläche zwischen Sammel- und Trenngel gesammelt hatten. Anschließend wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Der Gellauf wurde beendet, wenn der Farbstoff des Probenpuffers das Gel vollständig passiert hatte.

2.3.5.2 Proteintransfer und Immundetektion

Der Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen erfolgte mittels *Wet Blot* mit Transferpuffer für 2 h bei 100 V (ein Gel) bzw. 120 V (zwei Gele). Die Membranen wurden anschließend mit Ponceau S gefärbt, um zu überprüfen, ob der Transfer erfolgreich war. Nach dem Entfärben mit TBS-T wurden die Membranen für 60 min. in 5 %iger Milchlösung (gelöst in TBS-T) geblockt. Die anschließende Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnungen vgl. 2.1.4) erfolgte anschließend entweder über Nacht bei 4°C oder für 1,5 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurden die Membranen für 1 h mit dem jeweiligen HRP-konjugierten sekundären Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Membranen erneut dreimal mit TBS-T gewaschen und anschließend zum Entwickeln mit dem Immobilon Forte HRP Substrat inkubiert. Die Detektion des Chemilumineszenzsignals erfolgte am ChemiDoc Imaging System.

Sollten mehrere Proteine nacheinander detektiert werden, wurden die Membranen nach dem Entwickeln kurz in TBS-T gewaschen und anschließend gestrippt. Dazu wurden sie zunächst 15 min. in *stripping buffer* inkubiert, wobei die Lösung zwischendurch einmal gewechselt wurde. Anschließend wurden die Membranen zweimal 10 min. in PBS und zweimal 5 min. in TBS-T gewaschen. Nach erneutem Blocken für 30 min. konnten die Membranen zur Detektion weiterer Proteine verwendet werden.

Zur Quantifizierung der Signale wurde die Software Image Studio Lite (LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE, USA) verwendet.

2.3.6 Statistik

Die bei den Abbildungen angegebene Zahl an Experimenten bezeichnet die Anzahl der Ansätze, die zur Berechnung von Mittelwerten und SEM verwendet wurden. Die jeweiligen Ansätze stammten von Zellen unterschiedlicher Passage, die an verschiedenen Tagen gesplittet und ausgesät wurden. Die Daten wurden mit der GraphPad Prism-Software (GraphPad, San Diego, CA) statistisch analysiert. Der ungepaarte zweiseitige Student's t-Test wurde verwendet, um das Signifikanzniveau für Vergleiche zweier Gruppen zu berechnen. *One-way* ANOVA mit Tukey-Post-Test wurde für Vergleiche von einer Variablen in mehr als zwei Gruppen verwendet. Ab einem p-Wert $< 0,05$ wurden Unterschiede zwischen den Gruppen als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Funktionelle Untersuchung der CACNA1H^{M1549V}-Mutante im adrenalen Zellmodell

In adrenalen Zelllinien wurde bisher nur untersucht, welchen Einfluss die CACNA1H^{M1549V}-Mutante auf die Aldosteronproduktion und die Expression von CYP11B2 hat (Reimer et al. 2016). Experimente, wie sich die Mutante auf elektrophysiologische Eigenschaften der Zelle auswirkt, erfolgten allerdings bisher ausschließlich im nicht-adrenalen Modell (Scholl et al. 2015). In dieser Arbeit wurde nun untersucht, welchen Einfluss die CACNA1H^{M1549V}-Mutante auf die Elektrophysiologie, die Ca^{2+}-Aktivität und den intrazellulären pH-Wert der adrenalen Zelllinie NCI-H295R hat, um so den Pathomechanismus dieser Mutante besser verstehen zu können.

3.1.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von Wildtyp und mutiertem CACNA1H in Nebennierenzellen

Mittels Ganzzell Patch Clamp Messungen wurde zunächst die spannungsabhängige Aktivierung und Inaktivierung von CACNA1H-induzierten Strömen gemessen. Scholl et al. fanden bei Messungen an HEK-Zellen eine verzögerte Aktivierung und Inaktivierung durch CACNA1H^{M1549V} (Scholl et al. 2015). Gleiches wurde hier auch in adrenalen Zellen beobachtet. Abbildung 7A zeigt typische Traces der transient aktivierten Einwärtsströme in NCI-Zellen, die mit Wildtyp- oder mutiertem CACNA1H transfiziert waren. Eine Zusammenfassung der Kinetik von Aktivierung und Inaktivierung mit den Mittelwerten aus allen Experimenten ist in Abbildung 7D dargestellt. Weiterhin wurden CACNA1H^{WT} und CACNA1H^{M1549V} in NCI-Zellen – im Vergleich zu HEK293T-Zellen (Scholl et al. 2015) – bei niedrigerem Membranpotential aktiviert (Median von V_c für I_{max}: MUT -60 mV; WT -50 mV). Ebenso war der Unterschied in der Aktivierung zwischen Mutante und Wildtyp ausgeprägter. Zusätzlich war ein Großteil der mutierten Kanäle bereits in Bereichen aktiviert, in denen das Ruhemembranpotential von nativen Nebennierenzellen liegt. Dieses beträgt bei physiologischen K^+-Konzentration normalerweise ca. -80 mV (Hu et al. 2012). Die Wildtypkanäle wurden hingegen erst bei Membranpotentialen größer -70 mV aktiviert (vgl. Abbildung 7B). Die Überexpression von Wildtyp- und mutiertem CACNA1H führte außerdem zu einer signifikanten Depolarisation des Membranpotentials im Vergleich zu den Zellen der Vektorkontrolle. Dabei war das Membranpotential der Mutantenzellen noch etwas stärker depolarisiert als das der Wildtypzellen

(Mittelwert V_m: MUT -56 mV; WT -61 mV; Vektor -72 mV). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (p = 0,15; vgl. Abbildung 7C).

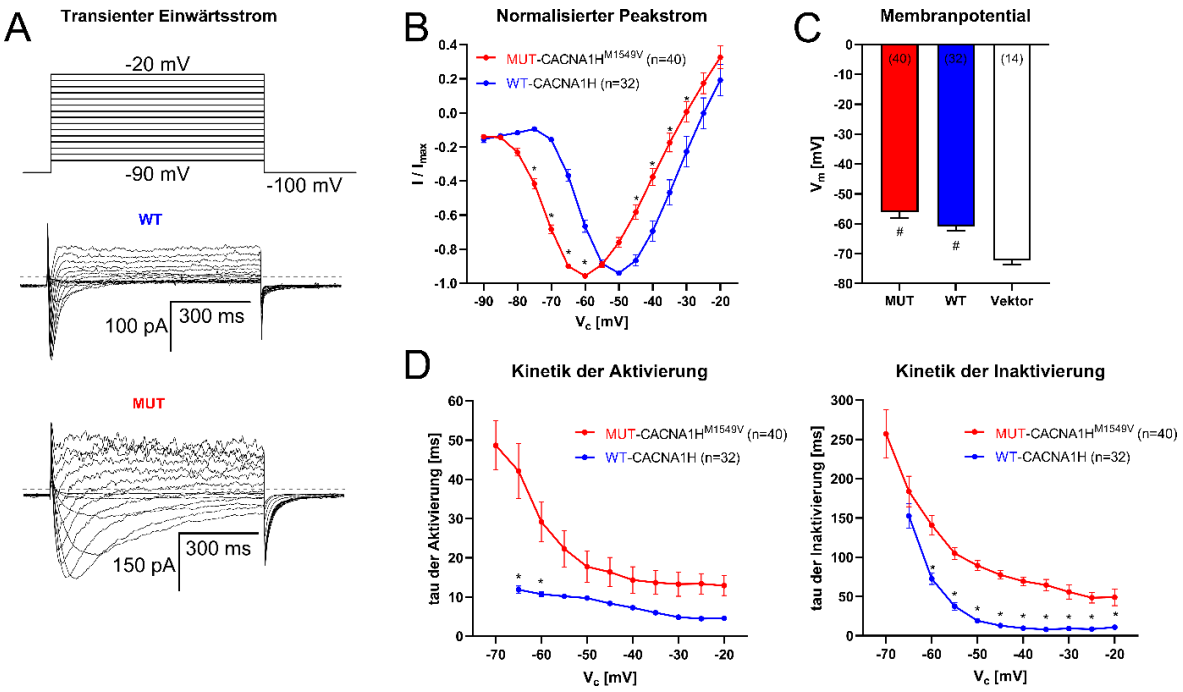


Abbildung 7: ***Elektrophysiologische Charakterisierung von CACNA1H^{M1549V} in NCI-Zellen.*** *(A) Repräsentative Traces von transient aktivierten Einwärtsströmen in Wildtyp- oder CACNA1H^{M1549V}-exprimierenden NCI-H295R-Zellen, gemessen durch Ganzzell Patch Clamp Experimente in Kontrolllösung. Die Ströme wurden aktiviert durch eine Serie von Depolarisierungsschritten von -90 mV bis -20 mV (in 5 mV Schritten), ausgehend jeweils von einem Haltepotential von -100 mV. Die gestrichelte Linie zeigt das Level an, bei dem der Strom Null ist. (B) Die Spannungsabhängigkeit der normalisierten Peakströme, gezeigt als Mittelwert ± SEM, zeigt eine Verschiebung der Aktivierung der Ströme in den Zellen, die die Mutante exprimieren, in Richtung des Ruhemembranpotentials nativer Glomerulosazellen (ca. -80 mV). * bedeutet p < 0,05 im Vergleich von WT und MUT. (C) Unter Kontrollbedingungen war das Membranpotential in den Zellen, die den Wildtyp oder die Mutante exprimieren, im Vergleich zur Vektorkontrolle depolarisiert. Die Depolarisation war ausgeprägter in den Mutantenzellen. Gezeigt ist der Mittelwert ±SEM, # bedeutet p < 0,05 im Vergleich von WT oder Mutante gegen die Vektorkontrolle. (D) Die Zellen, die mit CACNA1H^{M1549V} transfiziert waren, zeigen eine verzögerte Aktivierung und Inaktivierung, verglichen mit den Wildtyp-exprimierenden Zellen. Gezeigt ist der Mittelwert ±SEM, * bedeutet p < 0,05 im Vergleich von WT und Mutante. Die Zahl in Klammern gibt jeweils die Anzahl an unabhängigen Experimenten wieder.*

3.1.2 Charakterisierung von CACNA1H^{M1549V} in nicht-adrenalen CHO-Zellen

Um mögliche zelllinienspezifische Effekte auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von CACNA1H zu testen, wurden Patch Clamp Experimente auch an CHO-Zellen durchgeführt, welche mit Wildtyp- oder mutiertem CACNA1H transfiziert waren. Es zeigte sich, dass die Maxima der

transienten Einwärtsströme in CHO-Zellen im Vergleich zu NCI-Zellen bei einem stärker depolarisierten Membranpotential lagen (Median von V_c für I_{max}: MUT -52,5 mV; WT -40 mV; vgl. Abbildung 8). Die Versuche an CHO-Zellen wurden mit denselben Lösungen und unter denselben Bedingungen durchgeführt wie die Experimente an NCI-Zellen. Daher könnte der Unterschied in der spannungsabhängigen Aktivierung von CACNA1H in Nebennierenzellen im Vergleich zu nicht-adrenalen Zellen durchaus auf zellspezifische Faktoren zurückzuführen sein. Dennoch wurde CACNA1H^{M1549V} auch in CHO-Zellen bei stärker hyperpolarisierten Potentialen aktiviert als CACNA1H^{WT}.

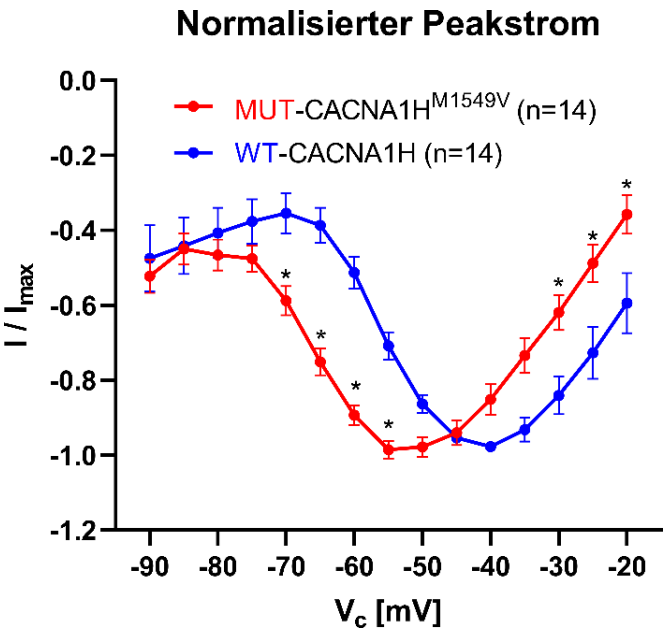


Abbildung 8: ***Spannungsabhängigkeit der Peakströme in CHO-Zellen.*** *In CHO-Zellen liegt das Maximum der transienten Einwärtsströme bei einem stärker depolarisierten Membranpotential als in NCI-Zellen (vgl. Abbildung 7). Allerdings aktiviert die Mutante auch in CHO-Zellen bei einem stärker hyperpolarisierten Potential als Wildtyp-CACNA1H. Gezeigt sind die Mittelwerte ±SEM, die Zahl n gibt die Anzahl an unabhängigen Experimenten wieder. * bedeutet p < 0,05 im Vergleich von MUT und WT.*

3.1.3 CACNA1H^{M1549V} verstärkt Oszillationen des Membranpotentials in NCI-Zellen

T-Typ Calciumkanäle spielen nicht nur eine Rolle beim Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle, sie sind auch an der Entstehung von oszillatorischen Änderungen des Membranpotentials in nativen Zellen der *Zona glomerulosa* beteiligt. Es wird vermutet, dass diese Oszillationen für die Regulation der Aldosteronproduktion wichtig sind (Hu et al. 2012). Unter Kontrollbedingungen zeigten NCI-Zellen, die Wildtyp-CACNA1H überexprimierten, und auch die meisten Zellen, die mit mutiertem CACNA1H transfiziert waren, keine Oszillationen. Dies liegt möglicherweise daran, dass die Zellen durch die Überexpression von CACNA1H zu stark depolarisiert waren, um eine Entstehung von Membranpotentialoszillationen zu ermöglichen. Daher wurden die Zellen durch eine konstante Strominjektion auf ein Membranpotential von ca. -80 mV hyperpolarisiert, was dem Ruhemembranpotential von Nebennierenzellen bei physiologischen K^+-Konzentration entspricht.

Unter diesen Messbedingungen traten in 95 % der Zellen mit mutiertem CACNA1H spontane Änderungen des Membranpotentials auf (vgl. Abbildung 9A). Charakteristisch für diese oszillatorischen Änderungen war eine schnelle Depolarisation mit Spitzenwerten von -25 mV bis -10 mV, gefolgt von einer raschen Repolarisation auf das Ausgangsniveau, welches dann wieder für einige Sekunden gehalten wurde (Abbildung 9A, oben). Andere Zellen mit CACNA1H^{M1549V} zeigten eine verzögerte Repolarisation, was dazu führte, dass die nächste Depolarisationsphase unmittelbar nach dem Erreichen des Ausgangsniveaus erfolgte (Abbildung 9A, Mitte). Die Breite der Peaks dieser Zellen mit mutiertem CACNA1H lag zwischen 1,6 s und 4,6 s (mit einem Median von 2,4 s). Die Frequenz betrug zwischen 0,05 Hz und 0,55 Hz (Median 0,22 Hz). Außerdem gab es Zellen mit unregelmäßigen Oszillationen, die sich sowohl in Amplitude als auch Breite der Peaks unterschieden (Abbildung 9A, unten). Bei den Zellen mit CACNA1H^{WT} zeigten nur 22 % vereinzelte spontane Änderungen des Membranpotentials (vgl. Abbildung 9B). Dabei waren die Peaks mit einer Breite zwischen 0,84 s und 2,96 s (Median 1,49 s) meist schmäler und die Frequenz niedriger (0,02 Hz – 0,14 Hz; Median 0,03 Hz) als in Zellen mit der Mutante.

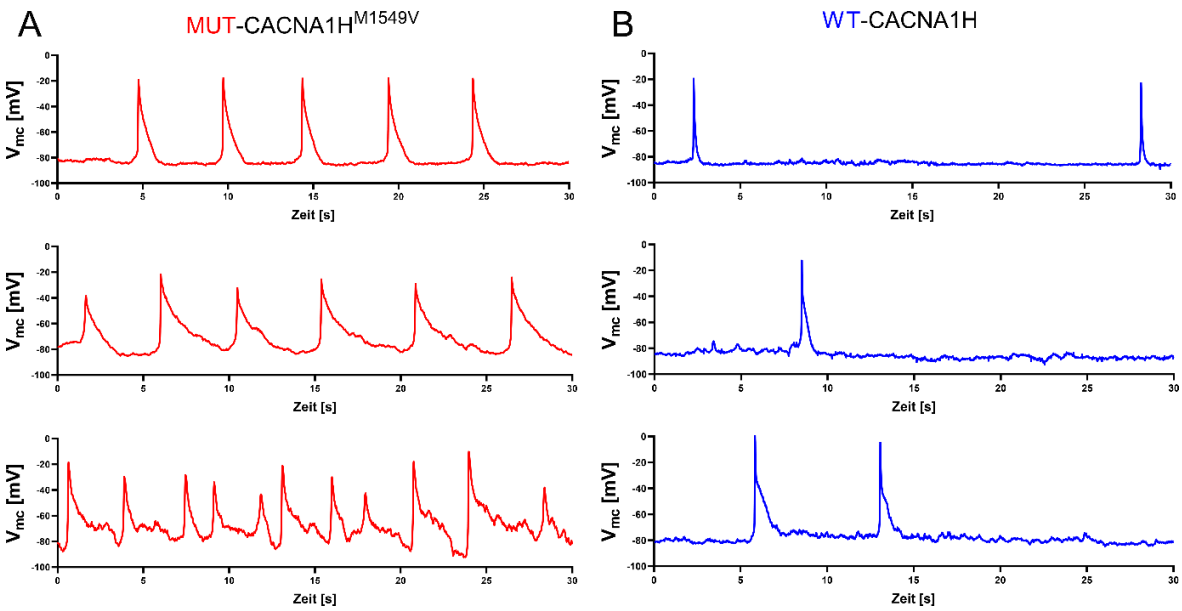


Abbildung 9: ***Oszillatorische Änderungen des Membranpotentials in NCI-Zellen, transfiziert mit CACNA1H^{M1549V} (A) oder CACNA1H^{WT} (B).*** *Veränderungen des Membranpotentials (V_{mc}) wurden mittels Ganzzell Patch Clamp Messungen in Kontrolllösung untersucht. Dabei wurde zunächst durch konstante Strominjektion (zwischen -3 und -15 pA) das basale Membranpotential auf -80 mV geklemmt und dann zusätzlich auftretende spontane Änderungen des Potentials beobachtet. Gezeigt sind repräsentative Messungen von insgesamt 39 (MUT) bzw. 27 (WT) Zellen, welche an 17 verschiedenen Tagen durchgeführt wurden. Oszillationen wurden definiert als mehr als ein depolarisierender Peak während der 3 min. zu Beginn des Experiments, in denen die Zellen mit Kontrolllösung umspült wurden. Zur besseren Darstellung der einzelnen Oszillationen sind hier nur Ausschnitte von 30 s gezeigt.*

3.1.4 Entstehung von Oszillationen abhängig von der extrazellulären Kaliumkonzentration

Ein Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration führt in Zellen der *Zona glomerulosa* zur Depolarisation und letztlich zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Aktivität. Im nächsten Schritt wurde deshalb untersucht, welchen Einfluss die extrazelluläre Kaliumkonzentration auf die Bildung der spontanen Membranpotentialoszillationen spielt.

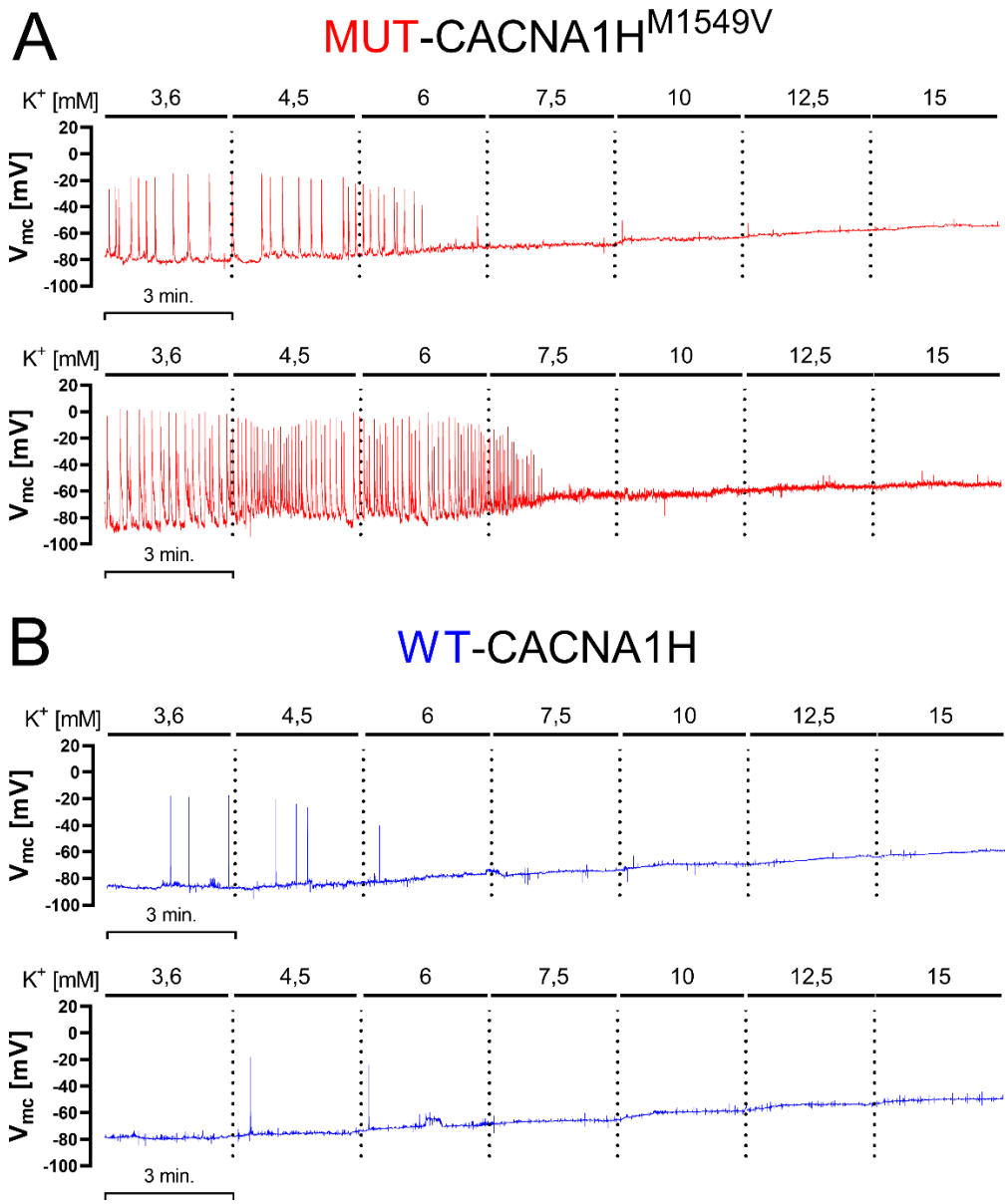


Abbildung 10: ***Einfluss der extrazellulären K^+-Konzentration auf die Entstehung spontaner Membranpotentialänderungen in NCI-Zellen, transfiziert mit CACNA1H^{M1549V} (A) oder CACNA1H^{WT} (B).*** *Das Membranpotential (V_{mc}) wurde dabei, wie bei Abbildung 9 beschrieben, mit konstanter Strominjektion gemessen. Die extrazelluläre K^+-Konzentration wurde schrittweise von 3,6 mM auf 15 mM erhöht. Gezeigt sind repräsentative Messungen von insgesamt 12 (MUT) bzw. 10 (WT) Zellen, welche an 12 verschiedenen Tagen durchgeführt wurden.*

Dazu wurde das Membranpotential der Zellen durch konstante Strominjektion zunächst auf -80 mV hyperpolarisiert. Anschließend wurde die extrazelluläre Kaliumkonzentration stufenweise von 3,6 mM K^+ auf 15 mM K^+ erhöht (3,6 – 4,5 – 6 – 7,5 – 10 – 12,5 – 15 mM), wobei die Zellen auf jeder Stufe drei Minuten stimuliert wurden. Die Strominjektion blieb dabei konstant auf dem Wert zu Beginn des Experiments. Die stufenweise Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration führte zu einer Depolarisation des basalen Membranpotentials zwischen den einzelnen Oszillationen der mit CACNA1H^{M1549V} transfizierten Zellen bzw. des Membranpotentials der Wildtyp exprimierenden Zellen. Bei 15 mM K^+ lag das Potential dabei maximal bei -57 ± 1,5 mV (MUT) bzw. -56 ± 2,3 mV (WT). Starke Oszillationen in Zellen mit CACNA1H^{M1549V} (vgl. Abbildung 10A) und auch vereinzelte Oszillationen in Zellen mit CACNA1H^{WT} (vgl. Abbildung 10B) verschwanden ab K^+-Konzentrationen größer als 6 mM. Bei einigen mit der Mutante transfizierten Zellen traten unmittelbar vor dem Verschwinden noch Oszillationen mit höherer Frequenz, aber kleinerer Amplitude auf (Abbildung 10A, unten). Einige der Wildtyp-Zellen, bei denen unter Kontrollbedingungen keine Oszillationen auftraten, zeigten im Bereich von 4,5 mM K^+ und 6 mM K^+ vereinzelte spontane Depolarisationen (vgl. Abbildung 10B, unten).

3.1.5 Einfluss der Temperatur auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von CACNA1H in Nebennierenzellen

Die hier gezeigten Patch Clamp Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Dies lag einerseits daran, dass es bei früheren Projekten schwierig war, in NCI-Zellen bei 37°C über einen längeren Zeitpunkt stabile Messungen zu erhalten. Andererseits sollten die Daten dadurch besser vergleichbar werden mit den Ergebnissen anderer Gruppen, die die Elektrophysiologie von CACNA1H-Mutanten im Zusammenhang mit Hyperaldosteronismus ebenfalls bei Raumtemperatur analysierten (Scholl et al. 2015; Daniil et al. 2016). Von Iftinca et al. wurde allerdings gezeigt, dass die Aktivität von T-Typ Calciumkanälen temperaturabhängig ist (Iftinca et al. 2006). Um zu untersuchen, welche Auswirkungen die Temperatur auf die Elektrophysiologie des mutierten CACNA1H in Nebennierenzellen hat, wurden zusätzlich einige Patch Clamp Experimente bei 37°C durchgeführt.

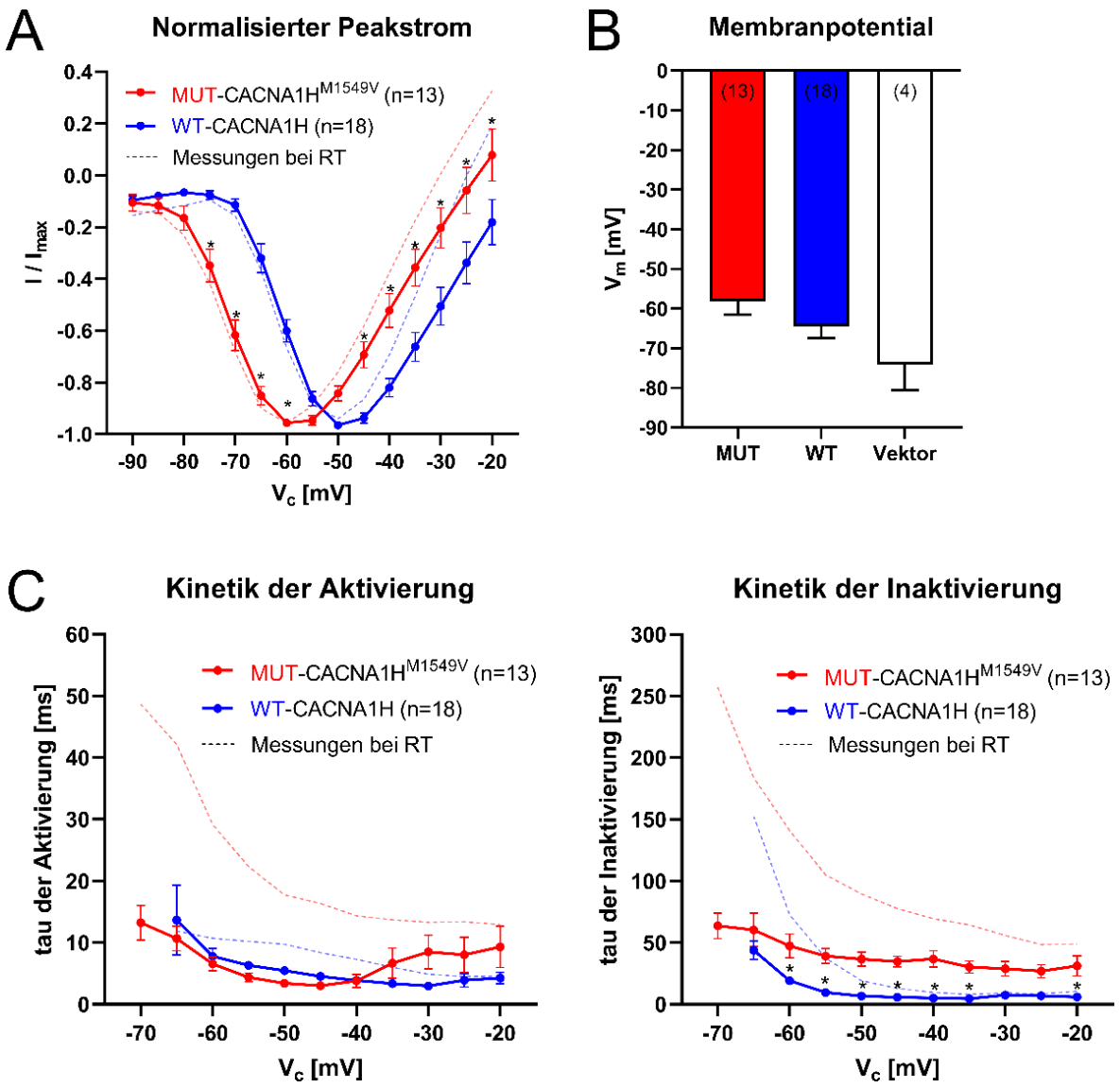


Abbildung 11: ***Elektrophysiologische Eigenschaften von CACNA1H bei 37°C.*** *Die Spannungsabhängigkeit der normalisierten Peakströme (A) sowie das basale Membranpotential (B) zeigen keine signifikanten Unterschiede zu den jeweiligen Werten bei RT. Die Kinetik von Aktivierung und Inaktivierung (C) wird durch die Temperaturerhöhung beschleunigt. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte ±SEM, die Anzahl an Experimenten ist in Klammern angegeben. In (A) und (C) sind zur besseren Vergleichbarkeit die entsprechenden Werte bei Raumtemperatur (vgl. Abbildung 7) als gestrichelte Linien dargestellt. * bedeutet p < 0,05 im Vergleich von Mutante und Wildtyp.*

Abbildung 11A zeigt, dass die Temperatur keinen signifikanten Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit der transienten Einwärtsströme von NCI-Zellen hat, die Wildtyp- oder mutierten CACNA1H exprimierten. Das Maximum der Ströme wurde von der Erhöhung der Temperatur auf 37°C nicht beeinflusst (Median von V_c für I_{max}: MUT -60 mV; WT -50 mV bei 37°C verglichen mit MUT -60 mV; WT -50 mV bei RT; vgl. Abbildung 7B). Auch das Membranpotential der Zellen, die mit CACNA1H^{WT} oder CACNA1H^{M1549V} transfiziert waren, war bei 37°C ähnlich depolarisiert wie bei Raumtemperatur

(Mittelwert V_m: MUT -58 mV; WT -64 mV; Vektor -74 mV bei 37°C verglichen mit MUT -56 mV; WT -61 mV; Vektor -72 mV bei RT; vgl. Abbildung 7C). Zwar sind die Unterschiede zwischen den Gruppen hier nicht signifikant, allerdings zeigt sich für den Vergleich von Vektorkontrolle und Mutante eine Tendenz (p = 0,07; vgl. Abbildung 11B). Ähnlich wie bei Iftinca et al. beschrieben, zeigte sich durch die Erhöhung der Temperatur allerdings eine beschleunigte Kinetik von Aktivierung und Inaktivierung (vgl. Abbildung 11C). Aber auch bei 37°C zeigt die Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant verlangsamte Inaktivierung, allerdings keine langsamere Aktivierung mehr.

3.1.6 Einfluss der Temperatur auf die Entstehung von Oszillationen des Membranpotentials

Weiterhin wurde untersucht, ob die Erhöhung der Temperatur Einfluss auf die Bildung spontaner Oszillationen des Membranpotentials hat. Dazu wurde das Membranpotential der Zellen durch konstante Strominjektion auf -80 mV hyperpolarisiert.

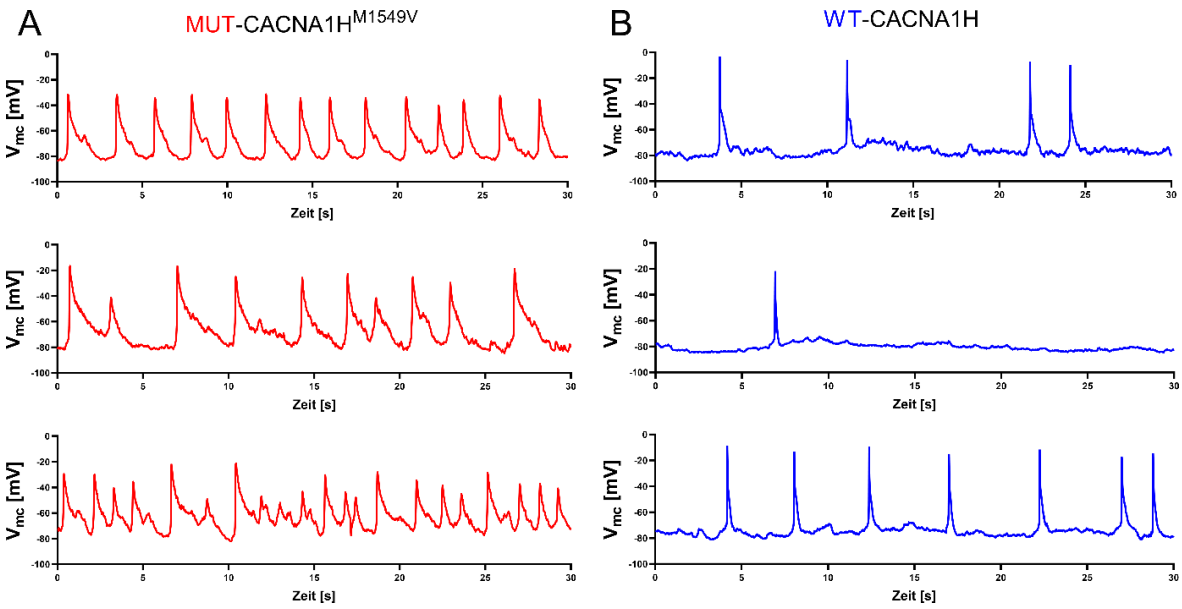


Abbildung 12: ***Oszillatorische Änderungen des Membranpotentials in NCI-Zellen, transfiziert mit CACNA1H^{M1549V} (A) oder CACNA1H^{WT} (B), gemessen bei 37°C.*** *Veränderungen des Membranpotentials (V_{mc}) wurden mittels Ganzzell Patch Clamp Messungen in Kontrolllösung untersucht. Dabei wurde durch konstante Strominjektion das Membranpotential auf -80 mV geklemmt. Gezeigt sind repräsentative Messungen von insgesamt 13 (MUT) bzw. 18 (WT) Zellen, welche an vier verschiedenen Tagen durchgeführt wurden. Oszillationen wurden definiert als mehr als ein depolarisierender Peak während der 3 min. zu Beginn des Experiments, in denen die Zellen mit Kontrolllösung umspült wurden. Zur besseren Darstellung der einzelnen Oszillationen sind hier nur Ausschnitte von 30 s gezeigt.*

Dabei zeigten alle Zellen, die mit CACNA1H^{M1549V} transfiziert waren, Oszillationen, welche in Frequenz und Breite der einzelnen Peaks ähnlich den Messungen bei Raumtemperatur waren. Nur die Amplitude dieser Oszillationen war etwas geringer, was möglicherweise an der schnelleren Inaktivierung liegt (vgl. Abbildung 12A). Ebenfalls vergleichbar zu den Messungen bei Raumtemperatur zeigten die Zellen, die mit CACNA1H^{WT} transfiziert waren, auch bei 37°C nur vereinzelt spontane Oszillationen, wobei auch dabei die Peaks schmäler waren als in den Zellen, die die Mutante exprimierten (vgl. Abbildung 12B).

3.1.7 Na^+-Abhängigkeit des CACNA1H-Stroms

APA-assoziierte Mutationen in anderen Ionenkanälen und Pumpen, beispielsweise KCNJ5, ATP1A1 und ATP2B3, führen zu einer abnormalen Na^+-Leitfähigkeit, wodurch es zur Depolarisation und als Folge davon zur erhöhten Aldosteronproduktion kommt (Choi et al. 2011; Azizan et al. 2013; Tauber et al. 2016). Weiterhin ist bekannt, dass T-Typ Calciumkanäle anders als L-Typ Kanäle nicht ausschließlich Ca^{2+}-selektiv sind, sondern zu einem gewissen Grad auch Na^+-Ionen passieren lassen (Stephens et al. 2015). Daher wurde untersucht, ob die CACNA1H^{M1549V}-Mutation einen Einfluss auf die Ca^{2+}-Selektivität hat und dadurch möglicherweise zu einer erhöhten Permeabilität für Na^+-Ionen führt.

Der Ersatz von Na^+ durch das membranimpermeable N-Methyl-D-glucamin (NMDG) führte dazu, dass sowohl in den CACNA1H^{WT}-, als auch in den CACNA1H^{M1549V}-exprimierenden Zellen die spannungsaktivierten transienten Einwärtsströme gleichermaßen reduziert waren (vgl. Abbildung 13). Entsprechend nahm der maximale Strom durch Wegnahme von Na^+ im Vergleich zum maximalen Strom unter Kontrollbedingungen um 26,6 ± 3,4 % (MUT) bzw. 24,5 ± 2,9 % ab. Weiterhin zeigte sich nach Wegnahme von Na^+ bei den Zellen mit mutiertem CACNA1H eine leichte Verschiebung der Aktivierungskurve hin zu weniger stark hyperpolarisiertem Membranpotential. Der Unterschied der Spannung, bei der der maximale Strom auftritt, betrug dabei im Mittel 4,7 ± 1,2 mV in den mit CACNA1H^{M1549V} transfizierten Zellen und 0,8 ± 3,1 mV in den Wildtyp-Zellen. Waren in der extrazellulären Lösung weder Na^+ noch Ca^{2+} vorhanden, konnte sowohl in den mit der Mutante transfizierten Zellen als auch den Wildtyp-Zellen kein transienter Einwärtsstrom mehr gemessen werden. Wurde der Ca^{2+}-freien Lösung anschließend wieder Na^+ zugesetzt, trat in den Mutanten-Zellen wieder ein signifikanter Einwärtsstrom auf (Abbildung 13A). Das Maximum dieses Na^+-abhängigen Stroms lag dabei bei einem stärker hyperpolarisierten Membranpotential als das Maximum des Stroms unter Kontrollbedingungen mit Na^+ und Ca^{2+}. In

den Zellen mit CACNA1H^{WT} zeigte sich mit Ca^{2+}-freier, aber Na^{+}-haltiger Lösung hingegen nur eine leichte, jedoch nicht signifikante Zunahme des Stroms (vgl. Abbildung 13B).

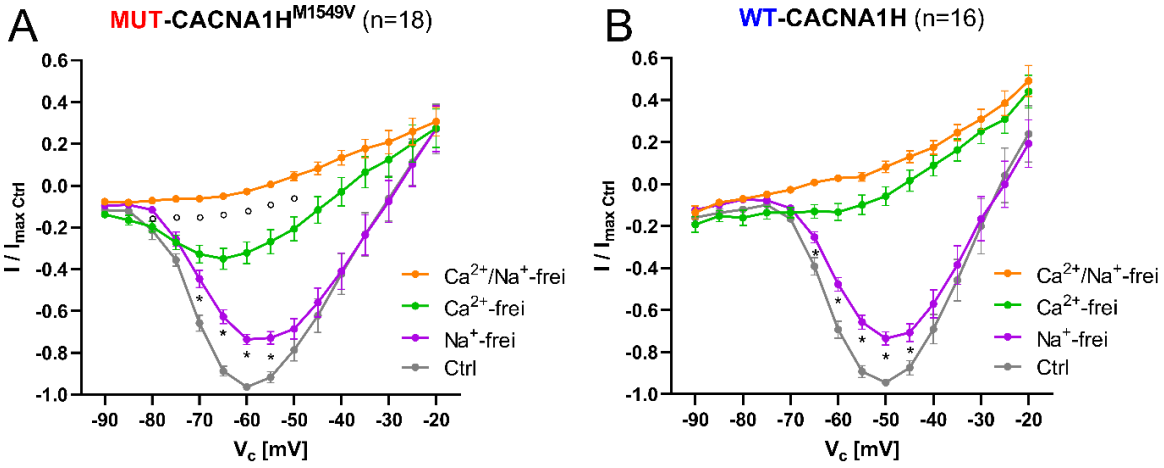


Abbildung 13: ***Einfluss der Entfernung von Na^{+} und Ca^{2+} aus der extrazellulären Lösung auf spannungsaktivierte Ströme in NCI -Zellen, transfiziert mit mutiertem CACNA1H^{M1549V} (A) oder Wildtyp-CACNA1H (B)****. Die Ströme wurden aktiviert durch eine Serie von Depolarisierungsschritten von -90 mV bis -20 mV (in 5 mV Schritten), ausgehend jeweils von einem Haltepotential von -100 mV. Die Ströme wurden auf den Spitzenstrom unter Kontrollbedingungen normalisiert. Anschließend wurden schrittweise Na^{+} und Ca^{2+} entfernt. Na^{+} wurde dabei durch das membranimpermeable NMDG ersetzt. Zuletzt wurde der Ca^{2+}-freien Lösung wieder Na^{+} zugesetzt. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte ±SEM, die Anzahl an unabhängigen Experimenten ist in Klammern angegeben. * zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich von Ctrl und Na^{+}-freier Lösung, ° im Vergleich von Ca^{2+}-freier und Ca^{2+}/Na^{+}-freier Lösung an. Das Signifikanzniveau wurde auf die Anzahl der Gruppen und Spannungsschritte korrigiert, wodurch ein p < 0,0004 als signifikant angesehen wurde.*

3.1.8 Na^{+}-Abhängigkeit der Membranpotentialoszillationen

Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluss die teilweise Na^{+}-Leitfähigkeit von CACNA1H auf die Bildung der spontanen Membranpotentialoszillationen hat. Dazu wurde zunächst das Membranpotential der Zellen durch eine konstante Strominjektion auf ca. -80 mV hyperpolarisiert. Anschließend wurde die extrazelluläre Kontrolllösung gegen eine Lösung ausgetauscht, bei der Na^{+} durch das membranimpermeable NMDG ersetzt war. Es zeigte sich, dass in den Zellen, die mit CACNA1H^{M1549V} transfiziert waren, das Membranpotential durch die Wegnahme von Na^{+} weiter hyperpolarisierte (vgl. Abbildung 14A). Dadurch, dass die Oszillationen bei den einzelnen Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftreten, entsteht hier bei der Bildung des Mittelwertes der Eindruck, dass das Membranpotential unter Kontrollbedingungen positiver als -80 mV liegt. Dass die Zellen durch Strominjektion tatsächlich auf ca. -80 mV hyperpolarisiert wurden, lässt sich an den Einzeltraces in Abbildung 14B erkennen. Hier zeigt sich auch, dass die Oszillationen des

Membranpotentials unter Na^+-freien Bedingungen teilweise gänzlich verschwanden oder zumindest mit geringerer Frequenz auftraten. CACNA1H^{WT}-exprimierende Zellen zeigten, wie bereits in den vorherigen Experimenten dargestellt, kaum Oszillationen. Auch hier stellte sich nach Wegnahme von Na^+ ein niedrigeres Membranpotential ein, auch wenn der Effekt weniger ausgeprägt war als bei den Mutanten-Zellen (vgl. Abbildung 14B).

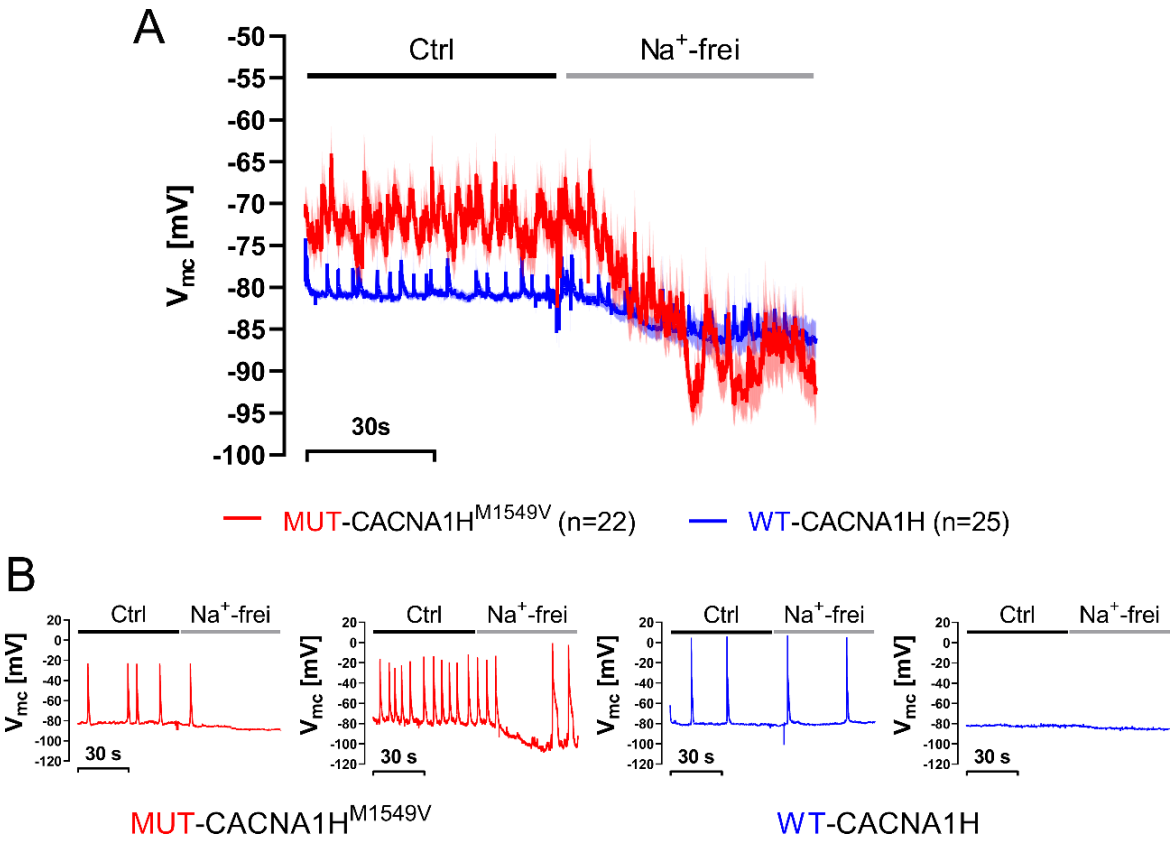


Abbildung 14: ***Einfluss der Entfernung von Na^+ aus der extrazellulären Lösung auf die Entstehung spontaner Membranpotentialänderungen in NCI-Zellen, transfiziert mit CACNA1H^{M1549V} oder CACNA1H^{WT}.*** *(A) Das Membranpotential (V_{mc}) wurde, wie bei Abbildung 9 beschrieben, mit konstanter Strominjektion gemessen. Na^+ wurde entfernt und durch das membranimpermeable NMDG ersetzt. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte ±SEM, die Anzahl an unabhängigen Experimenten ist in Klammern angegeben. (B) Gezeigt sind repräsentative Einzelmessungen von insgesamt 22 (MUT) bzw. 25 (WT) Zellen.*

3.1.9 Einfluss von CACNA1H^{M1549V} auf die intrazelluläre Ca^{2+}-Aktivität bei Raumtemperatur

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Imminger 2016) zeigten, dass das basale Ca^{2+}-Level in NCI-Zellen, welche CACNA1H^{M1549V} exprimieren, deutlich höher liegt als in Wildtyp oder Kontrollzellen. Weiterhin zeigten sich unter Kontrollbedingungen und bei leicht erhöhten extrazellulären

K^+-Konzentrationen Ca^{2+}-Oszillationen in den Mutanten-Zellen, aber nicht in den Zellen mit $CACNA1H^{WT}$. Ebenso wurde gezeigt, dass sowohl in Wildtyp- als auch Mutanten-Zellen die Ca^{2+}-Aktivität bereits bei einer geringeren Erhöhung der extrazellulären K^+-Konzentration ansteigt als dies bei den Vektorkontrollen der Fall ist. Die Ca^{2+}-Messungen wurden dabei standardmäßig bei 37°C durchgeführt (Imminger 2016). Zum besseren Verständnis der folgenden Ergebnisse zeigt Abbildung 28 die Ca^{2+}-Messungen bei 37°C, basierend auf den unter Imminger (2016) beschriebenen Versuchen. Wie bereits erwähnt, konnten Iftinca et al. zeigen, dass die Aktivität von CACNA1H temperaturabhängig ist (Iftinca et al. 2006). Daher wurde untersucht, welchen Einfluss die Temperatur auf Änderungen der Ca^{2+}-Aktivität in Zellen mit mutiertem CACNA1H hat. Dazu wurden Messungen mit dem Ca^{2+}-sensitiven Fluoreszenzindikator Fura-2 bei Raumtemperatur durchgeführt.

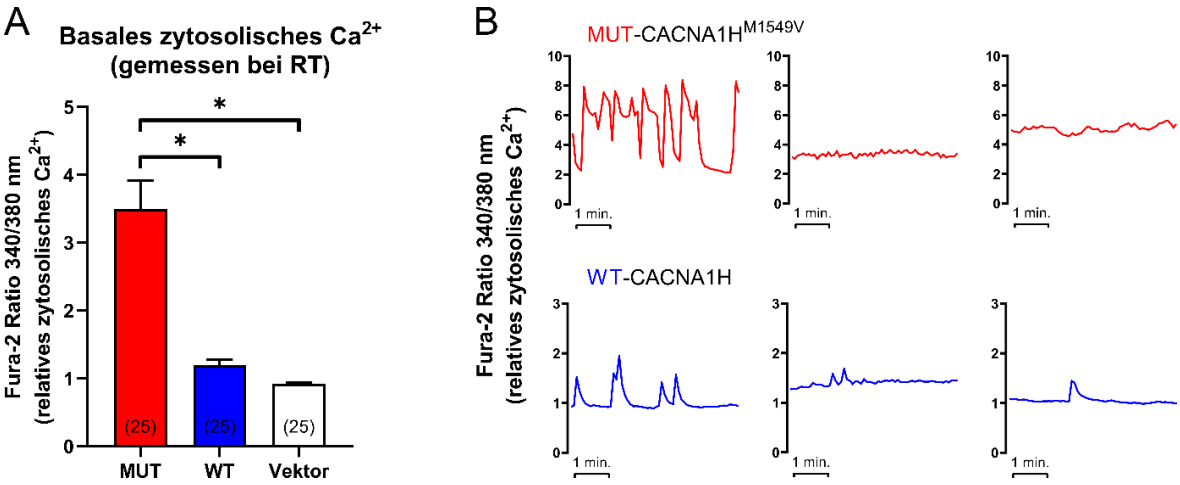


Abbildung 15: ***Basale Ca^{2+}-Aktivität in NCI-Zellen, transfiziert $CACNA1H^{M1549V}$ (rot), $CACNA1H^{WT}$ (blau) oder Kontrollvektor (weiß), gemessen bei Raumtemperatur.*** *Die Abbildung zeigt die Ratios der Fura-2-Fluoreszenzintensitäten nach Anregung bei 340 und 380 nm als Maß für cytosolisches Ca^{2+}. (A) Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte ±SEM, welche aus der gesamten Kontrollphase jeder einzelnen Zelle berechnet wurden. Die Anzahl an Experimenten ist in Klammern angegeben. * bedeutet $p < 0,05$. (B) Gezeigt sind repräsentative Einzelmessungen von insgesamt 25 (MUT) bzw. 25 (WT) Zellen während der Kontrollphase mit einer basalen K^+-Konzentration von 3,6 mM.*

Dabei zeigte sich, dass die basale Ca^{2+}-Aktivität der Zellen mit mutiertem CACNA1H im Vergleich zu den Wildtyp- und Vektorkontrollzellen bei Raumtemperatur ähnlich stark erhöht ist, wie dies von Imminger für 37°C gezeigt wurde (vgl. Abbildung 15A). Weiterhin zeigte ein Teil der Zellen, die mit $CACNA1H^{M1549V}$ transfiziert waren, auch bei Raumtemperatur starke oszillatorische Änderungen der Ca^{2+}-Aktivität, allerdings war der Anteil hier geringer als bei 37°C. Die meisten Zellen zeigten weitgehend konstant erhöhte Ca^{2+}-Level (vgl. Abbildung 15B, oben). Eine mögliche Ursache dafür

könnte sein, dass der energieabhängige Ca^{2+}-Efflux bei Raumtemperatur geringer war, wodurch der verstärkte Ca^{2+}-Einstrom schlechter kompensiert werden konnte. Die basale Ca^{2+} -Aktivität in Zellen, die $CACNA1H^{WT}$ exprimierten, war auch bei Raumtemperatur nur geringfügig, jedoch nicht statistisch signifikant erhöht. Weiterhin zeigten nur wenige Zellen kleinere Ca^{2+}-Peaks (vgl. Abbildung 15B, unten). Dies deckt sich ebenfalls mit den Ergebnissen der Messungen bei 37 °C.

3.1.10 Mibefradil reduziert die erhöhte Ca^{2+}-Aktivität in mit $CACNA1H^{M1549V}$ transfizierten NCI-Zellen

Weiterhin wurde überprüft, ob die erhöhten Ca^{2+}-Level in den $CACNA1H^{M1549V}$-exprimierenden Zellen tatsächlich auf eine veränderte Aktivität des Kanals zurückzuführen sind. Dazu wurde der T-Typ spezifische Calciumkanal-Inhibitor Mibefradil verwendet (Rossier et al. 1998; Martin et al. 2000). Zunächst wurden die Zellen mit einer extrazellulären K^+-Konzentration von 6 mM stimuliert, da bei dieser Konzentration auch $CACNA1H^{WT}$ bereits aktiviert ist.

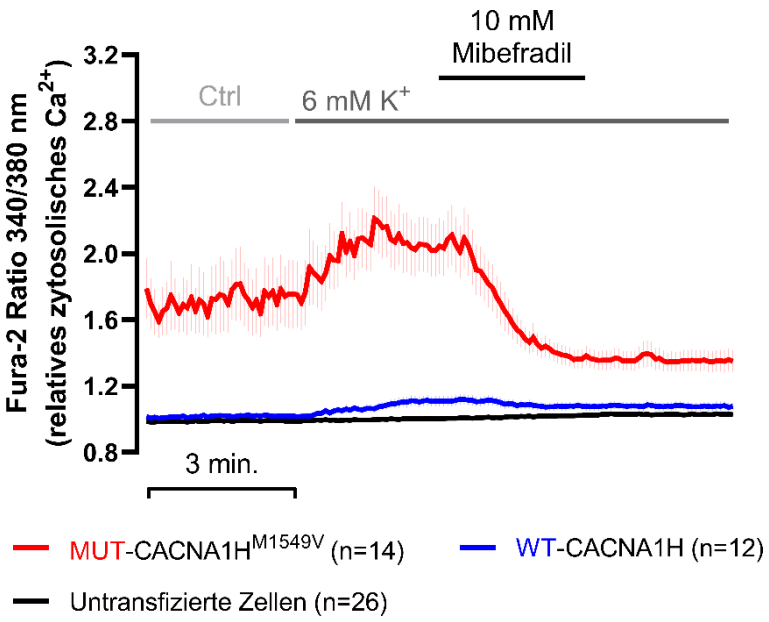


Abbildung 16: ***Effekt des T-Typ Calciumkanal-Inhibitors Mibefradil auf die zytosolische Ca^{2+}-Aktivität in NCI-Zellen, transfiziert $CACNA1H^{M1549V}$ (rot), $CACNA1H^{WT}$ (blau), im Vergleich zu untransfizierten Kontrollzellen (schwarz).*** *Die Abbildung zeigt den Mittelwert ± SEM der Ratios der Fura-2-Fluoreszenzintensitäten nach Anregung bei 340 und 380 nm als Maß für cytosolisches Ca^{2+}, gemessen bei 37°C. Dabei wurde das Ca^{2+}-Signal zunächst bei 3,6 mM K^+ und anschließend 6 mM K^+ gemessen. Anschließend wurde 10 µM Mibefradil zugegeben, um den Einfluss der CACNA1H-Hemmung auf die Ca^{2+}-Level zu testen. Die Anzahl an Experimenten ist in Klammern angegeben. Ein Teil dieser Experimente wurde von Katrin Imminger bereits während ihrer Bachelorarbeit durchgeführt (Imminger 2016).*

Bei dieser K^+-Konzentration stieg die Ca^{2+}-Aktivität in den Zellen mit CACNA1H^{M1549V} weiter an, und auch die Wildtyp-Zellen zeigen eine leichte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration. Die Zugabe von 10 µM Mibefradil führte in den Mutanten-Zellen zu einer signifikanten Reduzierung der Ca^{2+}-Aktivität (vgl. Abbildung 16), die allerdings noch immer höher lag als die Aktivität in den Wildtyp-Zellen. Ursache hierfür könnte zum einen eine unvollständige Hemmung des mutierten Kanals oder unspezifische Effekte des Inhibitors sein. Zum anderen könnten andere Parameter, welche ebenfalls Einfluss auf die erhöhte Ca^{2+}-Aktivität der Mutanten-Zellen nehmen (z.B. ein verringerter Ca^{2+}-Efflux), dafür verantwortlich sein. Trotz anschließender Entfernung des Inhibitors waren die Effekte nicht reversibel. Insgesamt zeigen die Experimente mit Mibefradil also, dass der größte Teil der erhöhten Ca^{2+}-Aktivität durch die veränderte Aktivität des mutierten CACNA1H verursacht wird.

3.1.11 Niedrigere Ca^{2+}-Aktivität durch Wegnahme von Na^+ in mit CACNA1H^{M1549V} transfizierten NCI-Zellen

Wie bereits beschrieben, verändert die CACNA1H^{M1549V}-Mutation die Na^+-Leitfähigkeit des Kanals. Möglicherweise trägt diese veränderte Leitfähigkeit indirekt zur Erhöhung der Ca^{2+}-Aktivität bei. Daher wurde untersucht, welchen Einfluss die extrazelluläre Na^+-Konzentration auf die intrazelluläre Ca^{2+}-Aktivität hat. Bei den Messungen mit dem Ca^{2+}-sensitiven Farbstoff Fura-2 wurde dazu das Na^+ in der extrazellulären Lösung durch das membranimpermeable NMDG ersetzt.

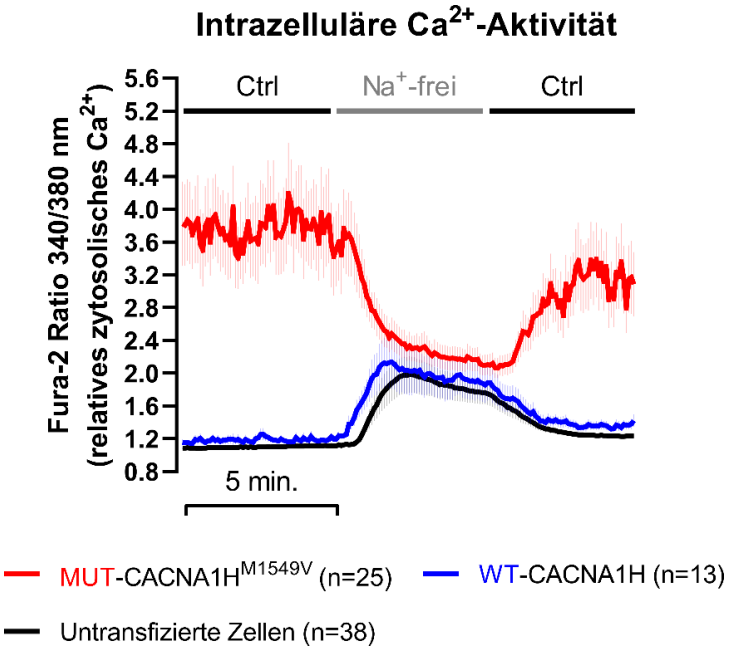


Abbildung 17: ***Einfluss der Entfernung von Na^+ aus der extrazellulären Lösung auf die zytosolische Ca^{2+}-Aktivität in NCI-Zellen, transfiziert mit CACNA1H^{M1549V} oder CACNA1H^{WT} im Vergleich zu untransfizierten Zellen.*** *Bei den Na^+-freien Lösungen wurde Na^+ durch das membranimpermeable NMDG ersetzt. Die Abbildung zeigt den Mittelwert ± SEM der Ratios der Fura-2-Fluoreszenzintensitäten nach Anregung bei 340 und 380 nm als Maß für cytosolisches Ca^{2+}, gemessen bei 37°C. Die Anzahl an Experimenten ist in Klammern angegeben.*

Dadurch wurde die Ca^{2+}-Aktivität in den Mutanten-Zellen deutlich geringer und gleichzeitig verschwanden die Oszillationen in jenen Zellen, die unter Kontrollbedingungen oszillatorische Änderungen der Ca^{2+}-Aktivität zeigten. In den Zellen, die $CACNA1H^{WT}$ exprimierten, und auch in untransfizierten Kontrollzellen stieg die Ca^{2+}-Aktivität unter Na^+-freien Bedingungen hingegen an und erreichte in etwa das gleiche Level wie in den Zellen mit $CACNA1H^{M1549V}$ unter denselben Bedingungen (vgl. Abbildung 17).

3.1.12 Rolle des intrazellulären pH-Werts in mit $CACNA1H^{M1549V}$ transfizierten NCI-Zellen

Untersuchungen von APA-Mutationen der Na^+/K^+-ATPase zeigten, dass diese Mutionen zu einem Protonenleck und folglich zur Ansäuerung der Zellen führen (Stindl et al. 2015). Außerdem ist beschrieben, dass die Wegnahme von extrazellulärem Na^+ in Glomerulosazellen der Ratte zu einer intrazellulären Ansäuerung führt, da die Triebkraft für den Na^+-abhängigen H^+-Export durch den Na^+/H^+-Austauscher (NHE) fehlt (Shepherd et al. 1992). Im nächsten Schritt wurde daher untersucht, ob auch die $CACNA1H^{M1549V}$-Mutation unter normalen Bedingungen zu einer Störung der pH-Homöostase führt und welchen Einfluss die Überexpression von $CACNA1H^{M1549V}$ unter Na^+-freien Bedingungen auf den intrazellulären pH-Wert nimmt. Dazu wurden Messungen mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff BCECF durchgeführt. Es zeigte sich, dass Zellen, die $CACNA1H^{M1549V}$ überexprimierten, bereits unter Kontrollbedingungen intrazellulär deutlich saurer sind. Die Wegnahme von Na^+ führte in diesen Zellen dazu, dass der pH über die komplette Zeit konstant weiter abfiel. Die Wildtyp-Zellen waren unter Kontrollbedingungen nur unwesentlich saurer als die Zellen, die mit der Vektorkontrolle transfiziert waren. Aber auch die Überexpression von $CACNA1H^{WT}$ führte unter Na^+-freien Bedingungen zu einer konstanten intrazellulären Ansäuerung, jedoch deutlich schwächer als bei den Zellen mit $CACNA1H^{M1549V}$. Die Vektorkontrollzellen hingegen reagierten nicht auf die Wegnahme von Na^+ (vgl. Abbildung 18A).

Als nächstes wurde die Frage untersucht, ob möglicherweise der intrazelluläre pH Einfluss auf die Funktion des mutierten Calciumkanals nimmt und die Abnahme der Ca^{2+}-Aktivität unter Na^+-freien Bedingungen eine Folge dieses möglichen Effektes ist. Daher wurden in einem weiteren Schritt NCI-Zellen mit Natriumacetat (NaAc) intrazellulär gezielt angesäuert. Um zu überprüfen, welche Wirkung NaAc auf die Mutante bzw. den Wildtyp hat, wurden zunächst BCECF-Messungen durchgeführt. Dabei zeigte sich erneut, dass bereits unter Kontrollbedingungen die Überexpression von CACNA1H zu einer Ansäuerung führt, wobei dieser Effekt in den Mutanten-Zellen noch stärker war als in den Wildtypzellen. Wurde NaAc (20 mM) zugegeben, kam es in allen Gruppen zu einem schnellen Abfall des pH, welcher nach kurzer Zeit in eine Plateau-Phase überging und nicht weiter

fiel. Wurde anschließend wieder Kontrolllösung zugegeben, stieg der pH wieder an. Dabei erfolgte der Anstieg in den mit CACNA1H^{M1549V} transfizierten Zellen schneller als bei den Wildtyp- und Vektorkontrollzellen und lag anschließend auch über dem pH der beiden anderen Gruppen, obwohl die Mutanten-Zellen zu Beginn ja deutlich saurer waren (vgl. Abbildung 18B). Dies deutet möglicherweise auf eine gewisse Überkompensation der Ansäuerung hin.

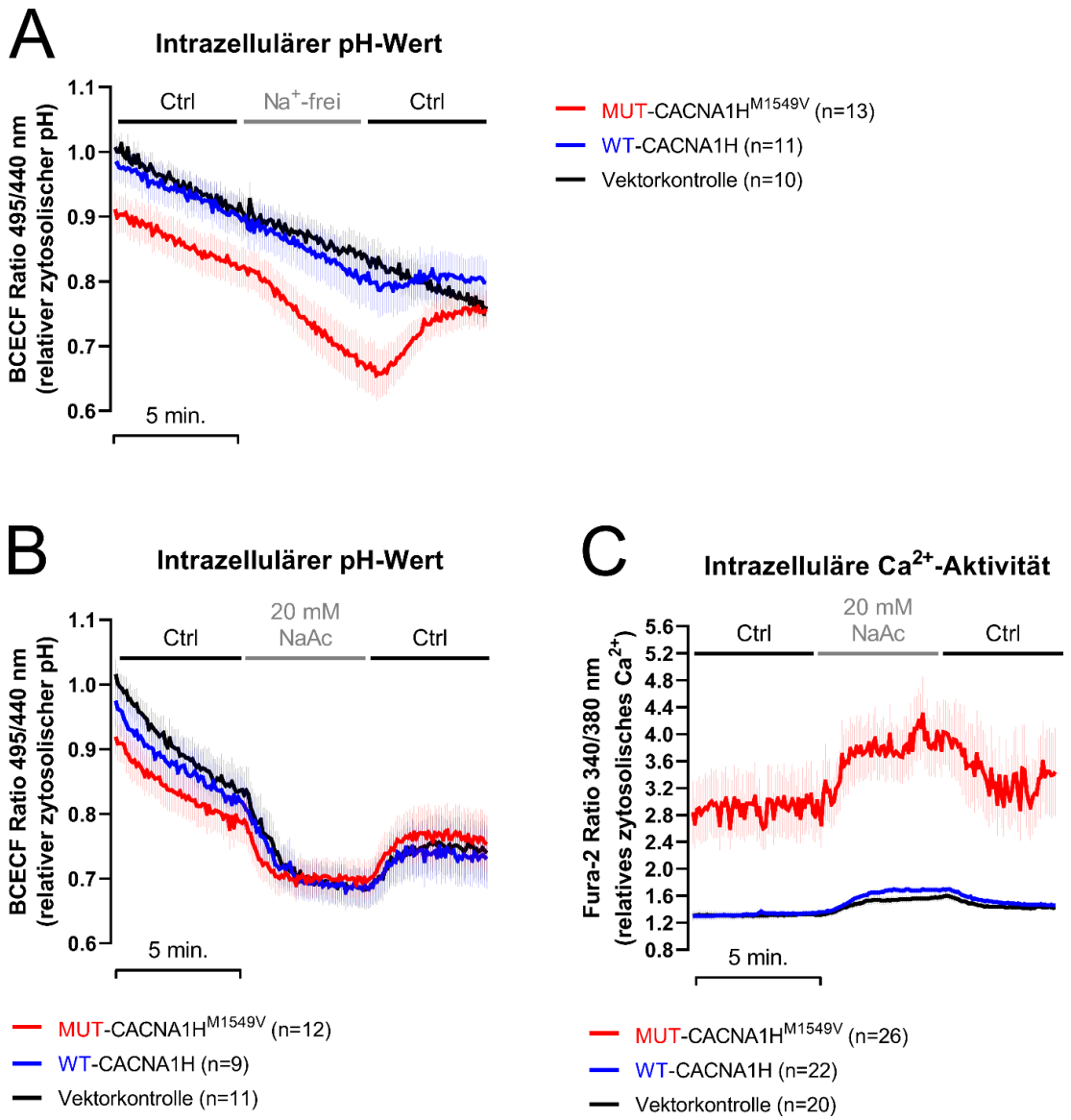


Abbildung 18: ***Einfluss der Entfernung von Na⁺ aus der extrazellulären Lösung (A) sowie von Natriumacetat (B) auf den intrazellulären pH sowie von NaAc auf die zytosolische Ca²⁺-Aktivität (C) in NCI-Zellen, transfiziert mit CACNA1H^{M1549V}, CACNA1H^{WT} bzw. Kontrollvektor.*** *(A+B) Gezeigt sind der Mittelwert ± SEM der Ratios der BCECF-Fluoreszenzintensitäten nach Anregung bei 495 und 440 nm als Maß für den intrazellulären pH, gemessen bei 37°C. Bei der Na⁺-freien Lösungen (A) wurde Na⁺ durch das membranimpermeable NMDG ersetzt. (C) Gezeigt sind der Mittelwert ± SEM der Ratios der Fura-2-Fluoreszenzintensitäten nach Anregung bei 340 und 380 nm als Maß für cytosolisches Ca²⁺, gemessen bei 37°C. Die Anzahl an Experimenten ist in Klammern angegeben.*

Anschließend wurde überprüft, wie sich die intrazelluläre Ansäuerung mit NaAc auf die Ca^{2+}-Aktivität auswirkt. Dabei zeigte sich, dass in den Zellen, die mit CACNA1H^{M1549V} transfiziert waren, das intrazelluläre Ca^{2+}-Level unter Kontrollbedingungen erneut deutlich erhöht war, unter 20 mM NaAc jedoch noch einmal ein Anstieg erfolgte. Auch in den Zellen, die CACNA1H^{WT} exprimierten, und in den Vektorkontrollzellen kam es unter NaAc zu einem leichten Anstieg der Ca^{2+}-Aktivität. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass NaAc zwar zu einer intrazellulären Ansäuerung, aber gleichzeitig zu einem Anstieg der Ca^{2+}-Aktivität führt. Dies legt den Schluss nahe, dass die in Abbildung 17 beobachtete Erniedrigung des zytosolischen Ca^{2+}-Levels unter Na^+-freien Bedingungen nicht pH-vermittelt ist.

3.1.13 Zusammenfassung der Untersuchungen zur CACNA1H^{M1549V}-Mutante

Die Ergebnisse zeigen, dass in der Gegenwart von physiologischen Ionenkonzentrationen der mutierte Kanal in adrenalen NCI-H295R-Zellen bei stärker hyperpolarisiertem Membranpotential öffnet und somit bereits im Bereich des Ruhemembranpotentials von nativen Glomerulosazellen aktiv ist. Dadurch wird deutlich, dass der zelluläre Hintergrund für die funktionelle Charakterisierung adrenaler Membranproteine eine wichtige Rolle spielt. Weiterhin führt die Mutation zur Entstehung von Oszillationen des Membranpotentials. Die frühere Aktivierung sowie die vermehrten Oszillationen führen zu einer Störung der zellulären Ca^{2+}-Homöostase. Auch die partielle Na^+-Leitfähigkeit des Kanals trägt zur Pathophysiologie des Kanals bei. Daneben führt die CACNA1H^{M1549V}-Mutante zu einem niedrigeren intrazellulären pH. Allerdings war diese Veränderung des pH nicht ursächlich für den Abfall der Ca^{2+}-Aktivität unter Na^+-freien Bedingungen. Zusammenfassend wird hier gezeigt, wie CACNA1H^{M1549V} zu einer von Stimulation unabhängigen Aldosteronproduktion führen kann.

3.2 Untersuchungen zum Einfluss des zellulären pH auf die Aldosteronproduktion

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, auf welche Weise der intrazelluläre pH-Wert die Aldosteronsynthese beeinflusst. Bei einem Teil der Kanäle und Transporter mit APA-assoziierten Mutationen, z.B. der Na^+/K^+-ATPase, kommt es zu einem unphysiologischen Protonenleck und folglich zur Ansäuerung der Zellen (Stindl et al. 2015). Außerdem wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Ansäuerung mit Natriumacetat (NaAc) in untransfizierten NCI-Zellen nach 48 h zu einer Erhöhung der Aldosteronproduktion und der CYP11B2-Expression führt, wobei diese Effekte verglichen mit der Stimulation mit einer erhöhten K^+-Konzentration deutlich geringer ausfallen (Stindl et al. 2015). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass bei gleichzeitiger Stimulation mit Angiotensin II (Ang II) der Effekt von NaAc auf die Aldosteronproduktion deutlich zunimmt (Schläger 2017). Gleiches wurde auch für eine gleichzeitige Stimulation mit erhöhter extrazellulärer K^+-Konzentration und NaAc gezeigt (unveröffentlichte Daten der AG Bandulik). Dies legt die Vermutung nahe, dass zu einer deutlichen Erhöhung der Aldosteronproduktion durch intrazelluläre Ansäuerung eine gleichzeitige Depolarisation nötig ist. Auf welche Art bzw. über welchen Weg NaAc Einfluss auf die Aldosteronproduktion nimmt, war jedoch weiterhin unklar. Daher wurden hier verschiedene Möglichkeiten untersucht, wie NaAc die Produktion von Aldosteron beeinflusst.

3.2.1 Einfluss von Ca^{2+}-Signalweg-Inhibitoren auf Kalium-stimulierte NCI-Zellen bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc

Die beiden Hauptstimuli der Aldosteronsynthese – Ang II und Erhöhung der extrazellulären K^+-Konzentration – vermitteln ihre Wirkung hauptsächlich durch eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+}-Konzentration. Dabei spielt in beiden Fällen der Ca^{2+}-Einstrom durch spannungsgesteuerte Ca^{2+}-Kanäle eine Rolle. Dadurch kommt es zur Aktivierung Ca^{2+}/Calmodulin-abhängiger Kinasen (CaMK) und als Folge davon zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren. Diese erhöhen letztendlich die Expression von CYP11B2 (Spät und Hunyady 2004). Um zu untersuchen, ob die Wirkungsweise von NaAc ebenfalls über den Ca^{2+}-Signalweg erfolgt, wurde dieser einerseits durch den T-Typ Calciumkanal-Inhibitor Mibefradil (10 µM) und andererseits durch den CaMK-Inhibitor KN93 (3 µM) gehemmt.

Zunächst wurden NCI-Zellen mit einer extrazellulären K^+-Konzentration von 15 mM sowie 10 mM NaAc stimuliert. Eine Gruppe von Zellen wurde mit 10 mM NaCl behandelt und diente als

Kontrolle, um Effekte der veränderten Osmolarität zu überprüfen. Es zeigte sich, dass die Erhöhung der K^+-Konzentration zu einer stärkeren Aldosteronproduktion führt und dass dieser Effekt durch NaAc noch leicht, jedoch nicht signifikant verstärkt wird. Mit den beiden Inhibitoren Mibefradil und KN93 sanken die Aldosteronwerte unter K^+-Stimulation wieder auf ihr Ausgangsniveau, auch bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc (vgl. Abbildung 19A). Die mRNA-Expression von CYP11B2 wurde unter 15 mM K^+ ebenfalls verstärkt. Hier zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Expression bei gleichzeitiger NaAc-Zugabe. Auch die CYP11B2-Expression konnte durch beide Inhibitoren deutlich gesenkt werden, erreichte dabei jedoch nicht das Level der Kontrollzellen. Ebenso hatte NaAc unter Inhibition des Ca^{2+}-Signalwegs keinen zusätzlichen Effekt mehr auf die K^+-stimulierte Expression von CYP11B2 (vgl. Abbildung 19B).

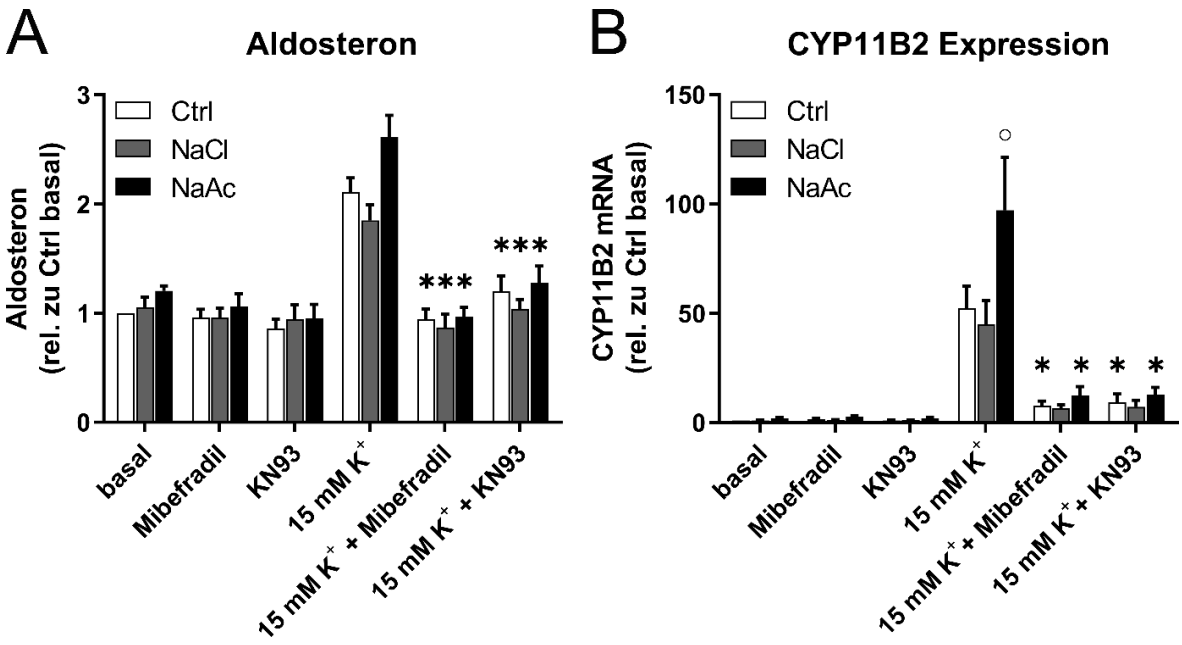


Abbildung 19: ***Aldosteronproduktion (A) und CYP11B2-mRNA-Expression (B) in NCI-Zellen, stimuliert mit 15 mM K^+ bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc unter Inhibition des Ca^{2+}-Signalwegs mit Mibefradil oder KN93.*** *Die Zellen wurden für 24 h mit 15 mM K^+ ± 10 mM NaAc stimuliert. 10 mM NaCl dienten als Osmolaritätskontrolle. Zur Hemmung des Ca^{2+}-Signalwegs wurden der T-Typ Calciumkanal-Inhibitor Mibefradil (10 µM) und der CaMK-Inhibitor KN93 (3 µM) verwendet. (A) Aldosteron wurde mittels ELISA im Zellkulturüberstand gemessen und auf die Gesamtproteinkonzentration normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte ±SEM, normalisiert auf den basalen Kontrollwert der unstimulierten Zellen (n = 6 bzw. 7). (B) Die CYP11B2-Expression wurde mittels qPCR bestimmt. Als Referenzgen wurde ACTB (β-Actin) verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte ±SEM, normalisiert auf den basalen Kontrollwert der unstimulierten Zellen (n = 5 bzw. 6). Da die Experimente mit Mibefradil und KN93 anfangs in getrennten Ansätzen erfolgten, ist die n-Zahl für die Gruppen „basal" und „15 mM K^+" höher als für die restlichen Gruppen. * bedeutet $p < 0,05$ im Vergleich von 15 mM K^+ + Inhibitor zu 15 mM K^+ allein. ○ bedeutet $p < 0,05$ im Vergleich von NaAc zu Ctrl. Ein Teil dieser Experimente wurde von Juliana Hünergardt bereits während ihrer Bachelorarbeit durchgeführt (Hünergardt 2018).*

3.2.2 Einfluss von Ca^{2+}-Signalweg-Inhibitoren auf Ang II-stimulierte NCI-Zellen bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc

Weiterhin wurde untersucht, wie sich die Hemmung des Ca^{2+}-Signalwegs auf Ang II-stimulierte NCI-Zellen bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc auswirkt. Dazu wurden die Zellen für 24 h mit 100 nM Ang II und 10 mM NaAc stimuliert. NaCl diente als Osmolaritätskontrolle. Die Hemmung des Ca^{2+}-Signalwegs erfolgte mithilfe des T-Typ Calciumkanal-Inhibitor Mibefradil (10 µM) bzw. des CaMK-Inhibitor KN93 (3 µM).

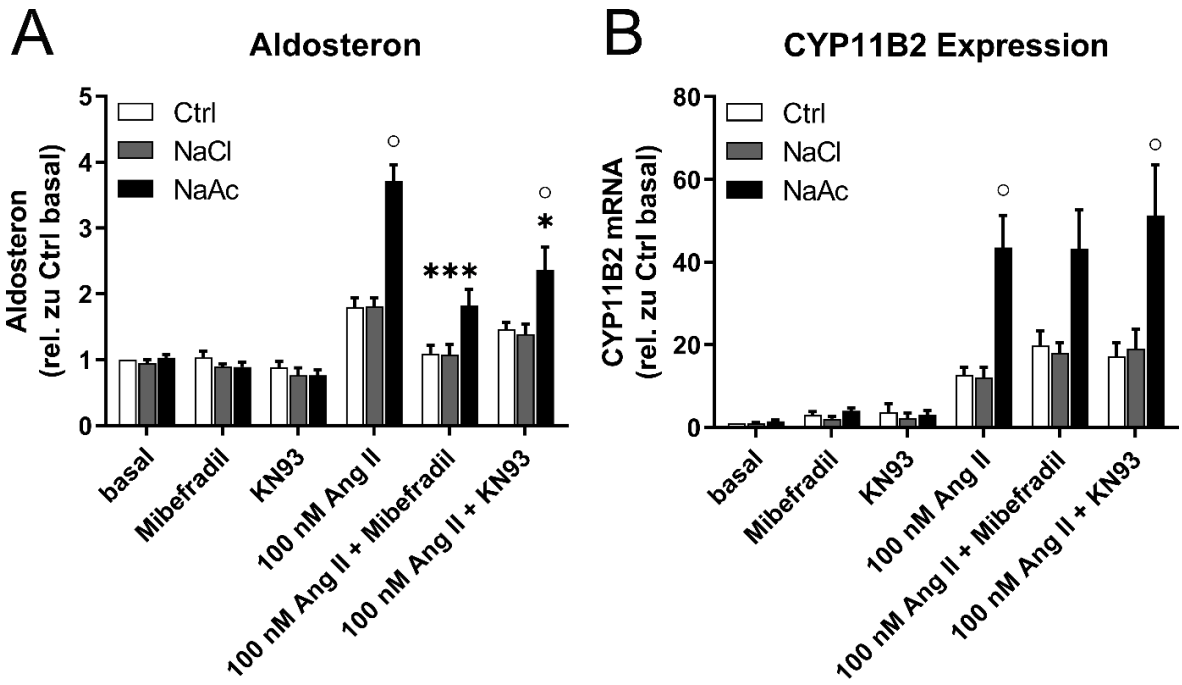


Abbildung 20: ***Aldosteronproduktion (A) und CYP11B2-mRNA-Expression (B) in NCI-Zellen, stimuliert mit 100 nM Ang II bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc unter Inhibition des Ca^{2+}-Signalwegs mit Mibefradil oder KN93.*** *Die Zellen wurden für 24 h mit 100 nM Ang II ± 10 mM NaAc stimuliert. 10 mM NaCl dienten als Osmolaritätskontrolle. Zur Hemmung des Ca^{2+}-Signalwegs wurden der T-Typ Calciumkanal-Inhibitor Mibefradil (10 µM) und der CaMK-Inhibitor KN93 (3 µM) verwendet. (A) Aldosteron wurde mittels ELISA im Zellkulturüberstand gemessen und auf die Gesamtproteinkonzentration normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte ±SEM, normalisiert auf den basalen Kontrollwert der unstimulierten Zellen. Die n-Zahl unterscheidet sich zwischen den einzelnen Gruppen, da die Experimente mit Mibefradil und KN93 anfangs in getrennten Ansätzen erfolgten: n = 8 für „basal" und „100 nM Ang II" bzw. n = 5 für die restlichen Gruppen. (B) Die CYP11B2-Expression wurde mittels qPCR bestimmt. Als Referenzgen wurde ACTB (β-Actin) verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte ±SEM, normalisiert auf den basalen Kontrollwert der unstimulierten Zellen. Da die Experimente mit Mibefradil und KN93 anfangs in getrennten Ansätzen erfolgten, ist die n-Zahl zwischen den einzelnen Gruppen unterschiedlich: n = 10 für „basal" und „100 nM Ang II", n = 6 für Gruppen mit Mibefradil und n = 7 für Gruppen mit KN93. * bedeutet p < 0,05 im Vergleich von 100 nM Ang II + Inhibitor zu 100 nM Ang II allein. ○ bedeutet p < 0,05 im Vergleich von NaAc zu Ctrl. Ein Teil dieser Experimente wurde von Juliana Hünergardt bereits während ihrer Bachelorarbeit durchgeführt (Hünergardt 2018).*

Die Stimulation mit Ang II führte zu einer erhöhten Aldosteronproduktion, welche durch gleichzeitige Zugabe von NaAc noch einmal signifikant erhöht wurde. Mit Mibefradil konnte die Aldosteronsynthese insgesamt gesenkt werden, allerdings führte hier NaAc noch immer zu einer leichten, nicht signifikanten Erhöhung der Aldosteronmenge. Ebenso konnte mit KN93 die Aldosteronproduktion insgesamt gesenkt werden, jedoch nicht auf das Level der Kontrollzellen. Hier führt NaAc ebenfalls dazu, dass die Menge an Aldosteron erhöht ist (vgl. Abbildung 20A). Die Stimulation mit Ang II führte weiterhin zu einer stärkeren Expression von CYP11B2. Auch hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung, wenn die Zellen gleichzeitig mit NaAc behandelt wurden. Interessanterweise hatte in den Ang II-stimulierten Zellen die Inhibition des Ca^{2+}-Signalwegs durch Mibefradil und KN93 keinerlei Effekt auf die mRNA-Expression von CYP11B2. Dies zeigt, dass die Wirkung von Ang II auf die Aldosteronsynthese nur teilweise Ca^{2+}-vermittelt ist und noch andere Signalwege eine Rolle dabei spielen. Außerdem könnte die verstärkende Wirkung von NaAc auf die Aldosteronproduktion möglicherweise auf einer Interaktion mit diesen anderen Signalwegen beruhen.

3.2.3 Einfluss von PKC- und PKD-Inhibitoren auf Ang II-stimulierte NCI-Zellen bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc

Wie oben bereits erwähnt, spielen für die Ang II abhängige Stimulation der Aldosteronproduktion neben Ca^{2+} noch weitere Signalwege eine Rolle. Auch scheint die Wirkung von NaAc ebenfalls nur teilweise über den Ca^{2+}-Signalweg zu erfolgen. Daher wurde nach weiteren möglichen Signalwegen gesucht, welche hierbei eine Rolle spielen könnten. Es ist bekannt, dass Ang II zu einer verstärkten Aktivierung der Proteinkinase D (PKD) führt (Romero et al. 2006). Weiterhin wurde berichtet, dass diese Ang II-abhängige Aktivierung der PKD durch die Proteinkinase C (PKC) erfolgt (Olala et al. 2014b). Daher wurde im Folgenden untersucht, welchen Einfluss eine Inhibition der PKC und der PKD auf die Ang II-stimulierte Aldosteronproduktion bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc hat.

Dazu wurden NCI-Zellen für 24 h mit 100 nM Ang II und 10 mM NaAc stimuliert. NaCl diente als Osmolaritätskontrolle. Als PKC-Inhibitor wurde Gö-6983 (10 µM) verwendet, CRT0066101 (2,5 µM) diente als PKD-Inhibitor. Es zeigte sich, dass die Inhibition der PKC keinerlei Einfluss auf die Aldosteronproduktion nimmt. Eine Hemmung der PKD hingegen konnte die Menge an Aldosteron senken. Außerdem führte die Behandlung mit CRT0066101 dazu, dass der verstärkende Effekt von NaAc unter Ang II verschwand (vgl. Abbildung 21A). Auf die CYP11B2-Expression hatte der PKC-Inhibitor Gö-6983 ebenfalls keinen Einfluss. Die Expression sank zwar mit dem Inhibitor in den Ang II und NaAc stimulierten Zellen etwas im Vergleich zu den Zellen ohne PKC-Hemmung, der Rückgang war jedoch nicht signifikant. Die Inhibition der PKD hingegen führte zu einer erhöhten

Expression von CYP11B2. Auch hier war durch gleichzeitige Gabe von NaAc die Expression signifikant erhöht (vgl. Abbildung 21B).

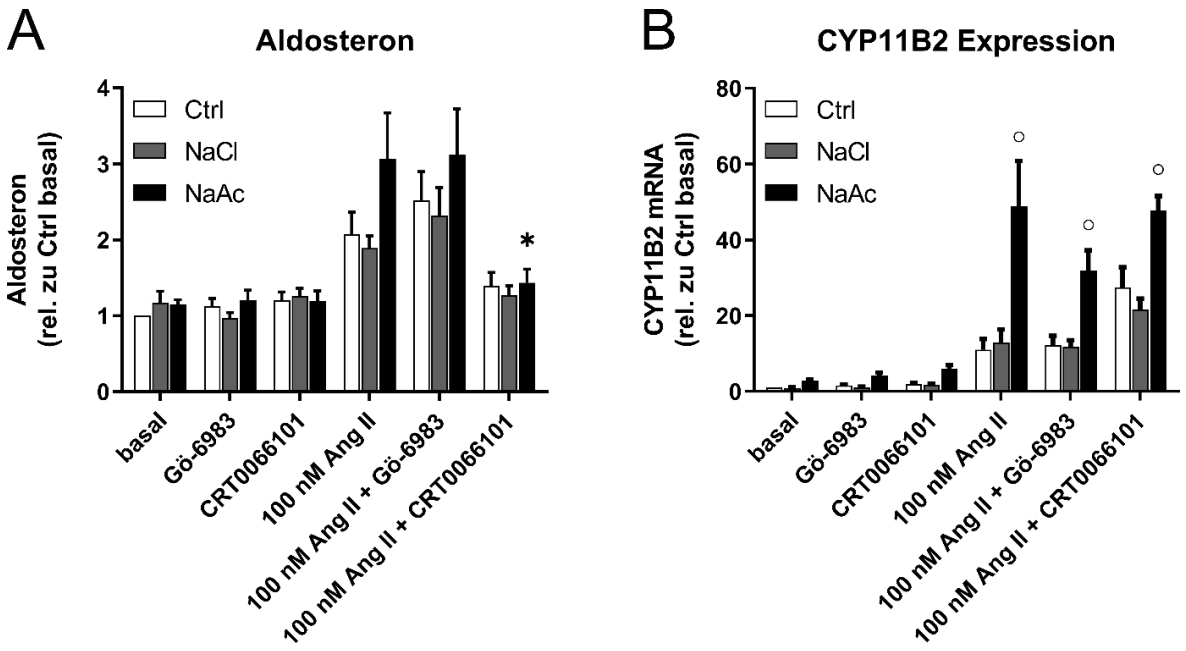


Abbildung 21: ***Aldosteronproduktion (A) und CYP11B2-mRNA-Expression (B) in NCI-Zellen, stimuliert mit 100 nM Ang II bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc unter Inhibition der Proteinkinase C und der Proteinkinase D.*** *Die Zellen wurden für 24 h mit 100 nM Ang II ± 10 mM NaAc stimuliert. 10 mM NaCl dienten als Osmolaritätskontrolle. Zur Hemmung der PKC wurde Gö-6983 (10 µM), zur Inhibition der PKD CRT0066101 (2,5 µM) verwendet. (A) Aldosteron wurde mittels ELISA im Zellkulturüberstand gemessen und auf die Gesamtproteinkonzentration normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte ±SEM, normalisiert auf den basalen Kontrollwert der unstimulierten Zellen. (n = 6) (B) Die CYP11B2-Expression wurde mittels qPCR bestimmt. Als Referenzgen wurde ACTB (β-Actin) verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte ±SEM, normalisiert auf den basalen Kontrollwert der unstimulierten Zellen. (n = 6) * bedeutet p < 0,05 im Vergleich von 100 nM Ang II + Inhibitor zu 100 nM Ang II allein. ○ bedeutet p < 0,05 im Vergleich von NaAc zu Ctrl.*

Da mit dem PKD-Inhibitor CRT0066101 zwar die Aldosteronproduktion gehemmt werden konnte, jedoch kein Einfluss auf die CYP11B2-Expression vorhanden war, wurde als nächstes die mRNA-Expression weiterer Gene untersucht, die an der Synthese von Aldosteron beteiligt sind.

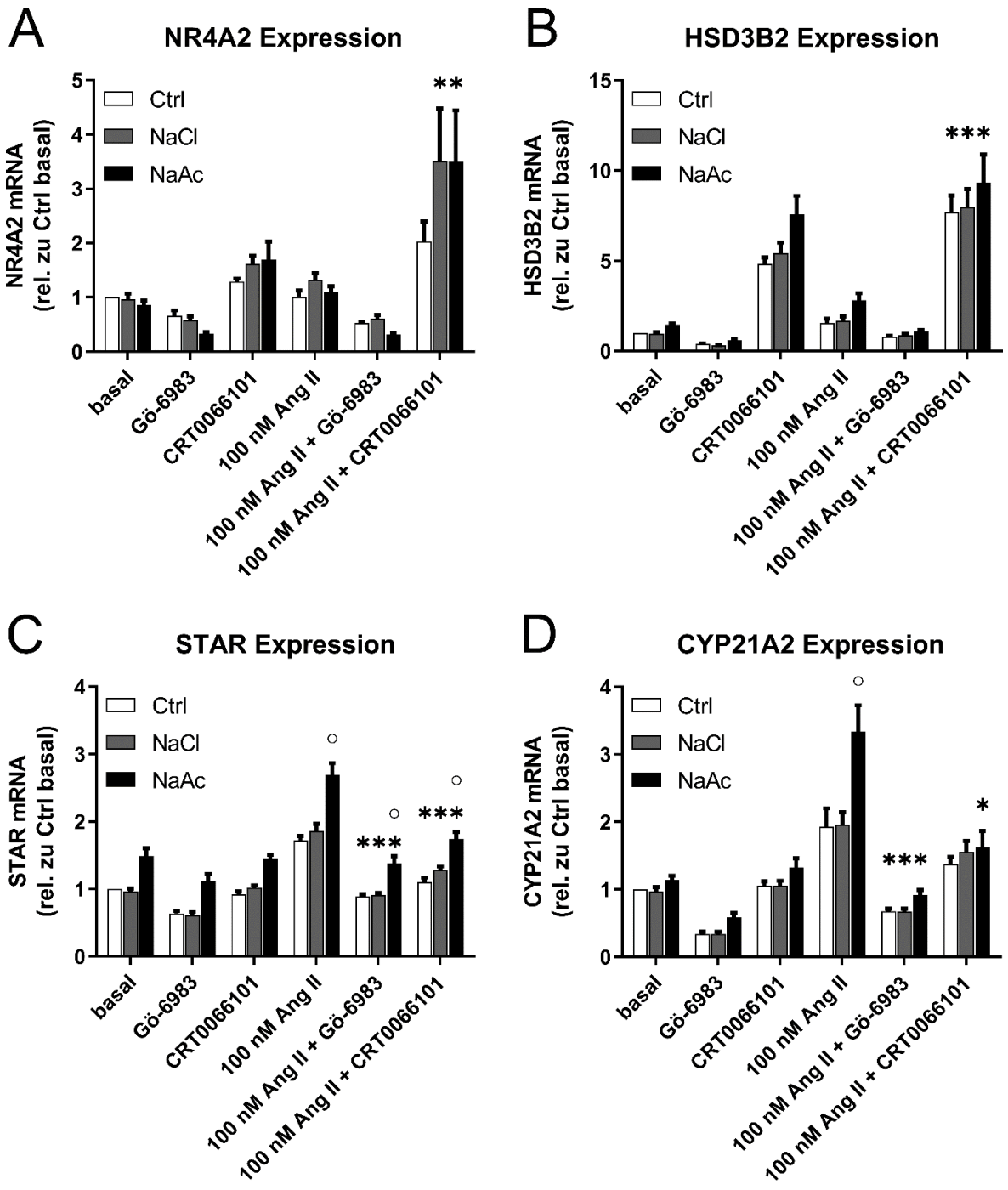


Abbildung 22: ***mRNA-Expression von NR4A2 (A), HSD3B2 (B), STAR (C) und CYP21A2 (D) in NCI-Zellen, stimuliert mit 100 nM Ang II bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc unter Inhibition der Proteinkinase C und der Proteinkinase D.*** *Die Zellen wurden für 24 h mit 100 nM Ang II ± 10 mM NaAc stimuliert. 10 mM NaCl dienten als Osmolaritätskontrolle. Zur Hemmung der PKC wurde Gö-6983 (10 µM), zur Inhibition der PKD CRT0066101 (2,5 µM) verwendet. Die Genexpression wurde mittels qPCR bestimmt. Als Referenzgen wurde ACTB (ß-Actin) verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte ±SEM, normalisiert auf den basalen Kontrollwert der unstimulierten Zellen. (n = 6) * bedeutet p < 0,05 im Vergleich von 100 nM Ang II + Inhibitor zu 100 nM Ang II allein. ○ bedeutet p < 0,05 im Vergleich von NaAc zu Ctrl.*

Die Expression von NR4A2, des wichtigsten Transkriptionsfaktors, der die CYP11B2-Expression reguliert (Bassett et al. 2004a), wird in Ang II-stimulierten NCI-Zellen durch Gö-6983 leicht, jedoch nicht signifikant gehemmt. Der PKD-Inhibitor CRT0066101 dagegen führt zu einer stärkeren NR4A2-Expression, wobei sich dieser Effekt durch NaAc noch verstärkt. Allerdings führt hier auch NaCl zu einer stärkeren Expression, sodass es sich möglicherweise um einen Effekt aufgrund der erhöhten Osmolarität handelt (Abbildung 22A). HSD3B2, welches die in der Nebenniere vorherrschende Form der 3β-HSD ist (Rhéaume et al. 1991), wird unter Ang II nur wenig stärker exprimiert. Die Hemmung der PKC führt auch hier zu einem leichten, wenn auch nicht signifikanten Rückgang der Expression. Im Gegensatz dazu kommt es mit dem PKD-Inhibitor CRT0066101 zu einer deutlichen Zunahme der HSD3B2-Expression. NaAc hat allerdings in keinem der Fälle einen signifikanten Einfluss auf die Expression von HSD3B2 (vgl. Abbildung 22B). Die Expression von STAR ist durch Ang II ebenfalls verstärkt, wobei sich durch die Behandlung mit NaAc eine zusätzliche Verstärkung des Effekts zeigt. Mit beiden Inhibitoren kann die STAR-Expression in Ang II stimulierten NCI-Zellen signifikant gesenkt werden, allerdings bleibt der verstärkende Effekt von NaAc trotzdem auch mit Gö-6983 und CRT0066101 bestehen (vgl. Abbildung 22C). CYP21A2 wiederum wird ebenfalls unter Ang II stärker exprimiert. Auch hier führt NaAc zu einer signifikanten Verstärkung der Expression. Die Hemmung der PKC führt dagegen zu einem signifikanten Rückgang der CYP21A2-Expression. Auch mit CRT0066101 kommt es zu einer leicht reduzierten Expression. Mit beiden Inhibitoren kann jedoch kein verstärkender Effekt von NaAc mehr beobachtet werden (vgl. Abbildung 22D).

3.2.4 Proteomanalyse zur Detektion bisher unbekannter Kandidaten mit möglichem Einfluss auf die Aldosteronsynthese

Um den Mechanismus, wie NaAc die Aldosteronsynthese insbesondere unter Ang II-Stimulation beeinflusst, noch besser zu verstehen, wurde eine Proteomanalyse durchgeführt. Damit sollte untersucht werden, welche Proteine durch Kalium und Ang II bei gleichzeitiger Gabe von NaAc stärker hoch- und herunterreguliert werden. Dazu wurden NCI-Zellen zunächst für 24 h mit 15 mM K^+ oder 100 nM Ang II und 10 mM NaAc stimuliert. 10 mM NaCl diente erneut als Osmolaritätskontrolle. Die eigentliche Proteomanalyse wurde von Frau Dr. Katharina Limm am Institut für funktionelle Genomik durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die Stimulation erfolgreich war, wurde ein Teil des Zellkulturmediums abgenommen und die Aldosteronmenge im Überstand bestimmt. Für die Proteomanalyse wurden fünf unabhängige Ansätze erstellt und daraus der Mittelwert der Aldosteronkonzentration für jede Gruppe gebildet (vgl. Abbildung 23).

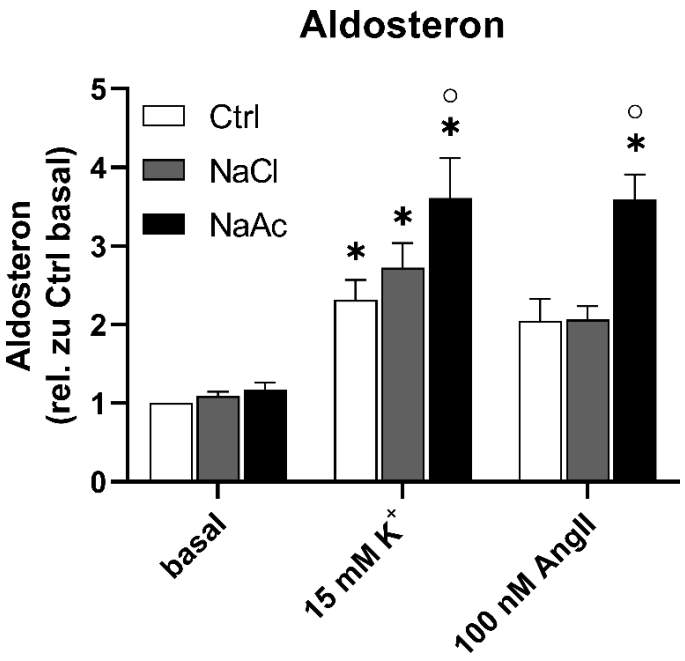


Abbildung 23: ***Mittlere Aldosteronwerte der Ansätze für die Proteomanalyse.*** *NCI-Zellen wurden für 24 h mit 15 mM K^+ oder 100 nM Ang II ± 10 mM NaAc stimuliert. 10 mM NaCl dienten als Osmolaritätskontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM der fünf Ansätze, die zur Proteomanalyse gegeben wurden. Sowohl K^+ als auch Ang II erhöhen die Aldosteronproduktion. Mit NaAc kann dieser Effekt jeweils noch verstärkt werden. * bedeutet $p < 0,05$ im Vergleich von K^+ bzw. Ang II zu basal. ○ bedeutet $p < 0,05$ im Vergleich von NaAc zu Ctrl.*

Bei der Proteomanalyse konnten insgesamt 3.464 verschiedene Proteine detektiert werden. Zur Auswertung der Daten wurden zunächst die Werte aller Behandlungen auf den Kontrollwert des jeweiligen Ansatzes normalisiert und anschließend Mittelwerte und SEM dieser normalisierten Werte über alle Ansätze gebildet. Diese Mittelwerte wurden dann verwendet, um die einzelnen Gruppen miteinander zu vergleichen. Dazu wurde mittels Student's T-Test untersucht, welche Proteine sich in ihrer Expression zwischen den Gruppen Ang II und Ang II + NaAc unterscheiden. Es zeigte sich, dass nur wenige Proteine reguliert waren, wenn das übliche Signifikanzniveau und eine ausreichend starke Regulation vorausgesetzt wurden. Um aufgrund der begrenzten Zeit am Ende der Doktorarbeit dennoch einen Nutzen aus den Proteomdaten ziehen zu können, wurden daher für die Auswahl von Kandidaten weniger strenge Kriterien angewendet. Allerdings geschah dies nur unter der Bedingung, dass sich die in der Proteomanalyse gefundene Regulation auch in unabhängigen Proben durch Western Blot verifizieren ließ. Unter diesen Voraussetzungen blieben 33 Proteine mit erhöhter und 38 mit erniedrigter Expression übrig. Eine Übersicht über diese Proteine sowie die Faktoren, um die sie durch die einzelnen Stimulationen reguliert werden, ist im Anhang in Abbildung 29 dargestellt. Zu diesen gehörten auch das StAR-Protein, die Aldosteronsynthase (CYP11B2) und die 21-Hydroxylase (CYP21A2), welche bereits bei früheren Versuchen untersucht wurden. Dass eine Regulation dieser Proteine auch in der Proteomanalyse gefunden wurde, kann als weiterer Beweis für die erfolgreiche Stimulation der Zellen gesehen werden. Die verbliebenen Proteine wurden mittels Literaturrecherche auf einen möglichen Zusammenhang mit Steroidhormonen, Nebenniere oder Aldosteron untersucht. Anhand dieser Literaturrecherche wurden

fünf Kandidaten ausgewählt, die im Anschluss durch weitere Versuche näher untersucht wurden. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die ausgewählten Kandidaten.

Tabelle 2: ***Übersicht über die Proteine, die aus den Ergebnissen der Proteomanalyse für weitere Untersuchungen ausgewählt wurden.*** *Angegeben sind jeweils der Name des Proteins sowie in Klammern der entsprechende Genname, der Faktor, um den die Regulation in der Gruppe „Ang II + NaAc" gegenüber den unstimulierten Kontrollzellen erhöht oder erniedrigt war, sowie der Grund, warum das jeweilige Protein für weitere Analysen ausgewählt wurde.*

Protein (Genname)	**Faktor d. Regulation**	**Grund der Auswahl**
CTTNBP2 N-terminal-like protein (CTTNBP2NL)	1,68	reguliert die Protein Phosphatase 2A (Sugimoto et al. 2013), welche wiederum STAR reguliert (Burns et al. 2000; Jones et al. 2000)
Apolipoprotein O (APOO)	1,50	Bestandteil des MICOS-Komplexes zur Bildung mitochondrieller Cristae (Koob et al. 2015; Huynen et al. 2016)
Glycerolkinase (GK)	1,37	Glycerolkinase-Mangel tritt häufig mit X-choromosomaler Nebennierenhypoplasie auf (Peter et al. 1998; Wikiera et al. 2012)
Cancerous inhibitor of PP2A (CIP2A)	0,70	negative Regulation der Protein Phosphatase 2A (Junttila et al. 2007), welche STAR reguliert (Burns et al. 2000; Jones et al. 2000)
G protein-activated inward rectifier potassium channel 4 (KCNJ5)	0,70	bekannte APA-Mutationen, definieren Familiären Hyperaldosteronismus Typ III (Choi et al. 2011)

3.2.5 mRNA-Expression der bei der Proteomanalyse ausgewählten Kandidaten

Zunächst wurde untersucht, ob die aus den Proteomdaten ausgewählten Kandidaten auch auf mRNA-Ebene reguliert sind. Die Expression der fünf Kandidaten wurde mittels qPCR untersucht. In den Kalium-stimulierten Zellen waren kaum Veränderungen der Expression erkennbar. Lediglich KCNJ5 war durch 15 mM K^+ und NaAc signifikant stärker exprimiert als mit NaAc allein. Alle anderen Gene zeigten keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abbildung 24A). In den Zellen, die mit 100 nM Ang II stimuliert worden waren, zeigte sich eine signifikant reduzierte Expression von CIP2A im Vergleich zu Zellen ohne Ang II. KCNJ5 wurde durch Ang II und NaAc ebenfalls stärker exprimiert als durch NaAc oder Ang II allein. Ebenso war GK in den Ang II und NaAc stimulierten Zellen signifikant erhöht. CTTNBP2NL und APOO zeigten dagegen keine signifikanten Veränderungen ihrer Expression (vgl. Abbildung 24B).

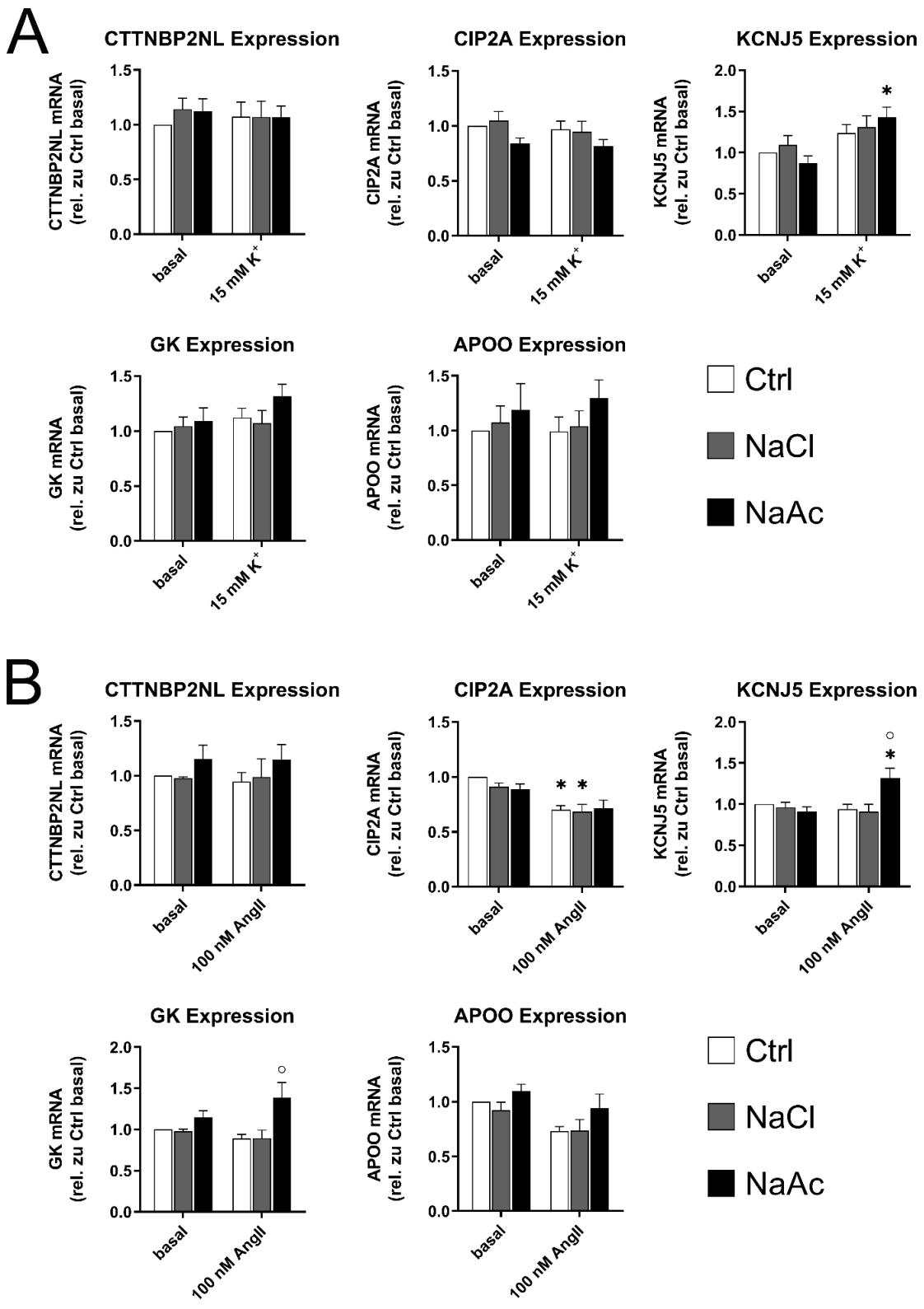


Abbildung 24: ***mRNA-Expression von CTTNBP2NL, CIP2A, KCNJ5, GK und APOO in NCI-Zellen, stimuliert mit 15 mM K^+ (A) bzw. 100 nM Ang II (B) bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc.*** *10 mM NaCl dienten als Osmolaritätskontrolle. Die Genexpression wurde mittels qPCR bestimmt. Zur Synthese der dazu verwendeten cDNA wurde RNA aus früheren Experimenten verwendet. Als Referenzgen wurde ACTB (β-Actin) verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte ±SEM, normalisiert auf den basalen Kontrollwert der unstimulierten Zellen. (n = 5) * bedeutet p < 0,05 im Vergleich von K^+ bzw. Ang II zu basal. ○ bedeutet p < 0,05 im Vergleich von NaAc zu Ctrl.*

3.2.6 Erhöhte CYP11B2-, STAR- und CYP21A2-Proteinexpression durch NaAc in Kalium- und Ang II-stimulierten NCI-Zellen

Da nur wenige Proteine reguliert waren, wenn das übliche Signifikanzniveau und eine ausreichend starke Regulation vorausgesetzt wurden, wurden für die Auswahl der Kandidaten weniger strenge Kriterien angewendet. Allerdings geschah dies nur unter der Voraussetzung, dass sich die Ergebnisse mit unabhängigen Proben auch im Western Blot zeigen lassen. Dabei wurde zunächst die Proteinexpression der Aldosteronsynthase (CYP11B2), des StAR-Proteins und der 21-Hydroxylase (CYP21A2) untersucht, da diese wichtige Schritte bei der Steroidhormonbiosynthese katalysieren und so als Beweis für eine erfolgreiche Stimulation gesehen werden können.

Es zeigte sich, dass die Proteinexpression von CYP11B2 in den NCI-Zellen insgesamt recht schwach war. Trotzdem kam es sowohl durch 15 mM K^+ als auch durch 100 nM Ang II zu einer vermehrten CYP11B2-Expression. Außerdem konnte bei beiden Stimulationen ein verstärkender Effekt von NaAc festgestellt werden (vgl. Abbildung 25A, oben). Wurden die Signale der Blots quantifiziert, zeigte sich, dass die Unterschiede nicht signifikant waren. Allerdings waren die Schwankungen auch recht hoch, was vermutlich auf die insgesamt schwache Expression zurückzuführen ist (vgl. Abbildung 25C, links). Die StAR-Expression war ebenfalls sowohl unter K^+- als auch Ang IIStimulation erhöht. Auch hier zeigt sich der verstärkende Effekt von NaAc (vgl. Abbildung 25A, Mitte). Die Quantifizierung des StAR-Signals ergab, dass die Expression durch Ang II + NaAc signifikant erhöht war im Vergleich mit sowohl NaAc als auch Ang II allein (vgl. Abbildung 25C, Mitte). Die Expression von CYP21A2 wurde sowohl durch K^+ als auch durch Ang II verstärkt. Außerdem führte NaAc ebenfalls zu einer verstärkten CYP21A2-Expression (vgl. Abbildung 25B, oben). Die quantifizierten Signale zeigten allerdings keine signifikanten Unterschiede. Dies liegt vermutlich daran, dass auch hier die Schwankungen teilweise recht hoch waren. Allerdings wurden hier bisher nur vier Wiederholungen durchgeführt (vgl. Abbildung 25C, rechts).

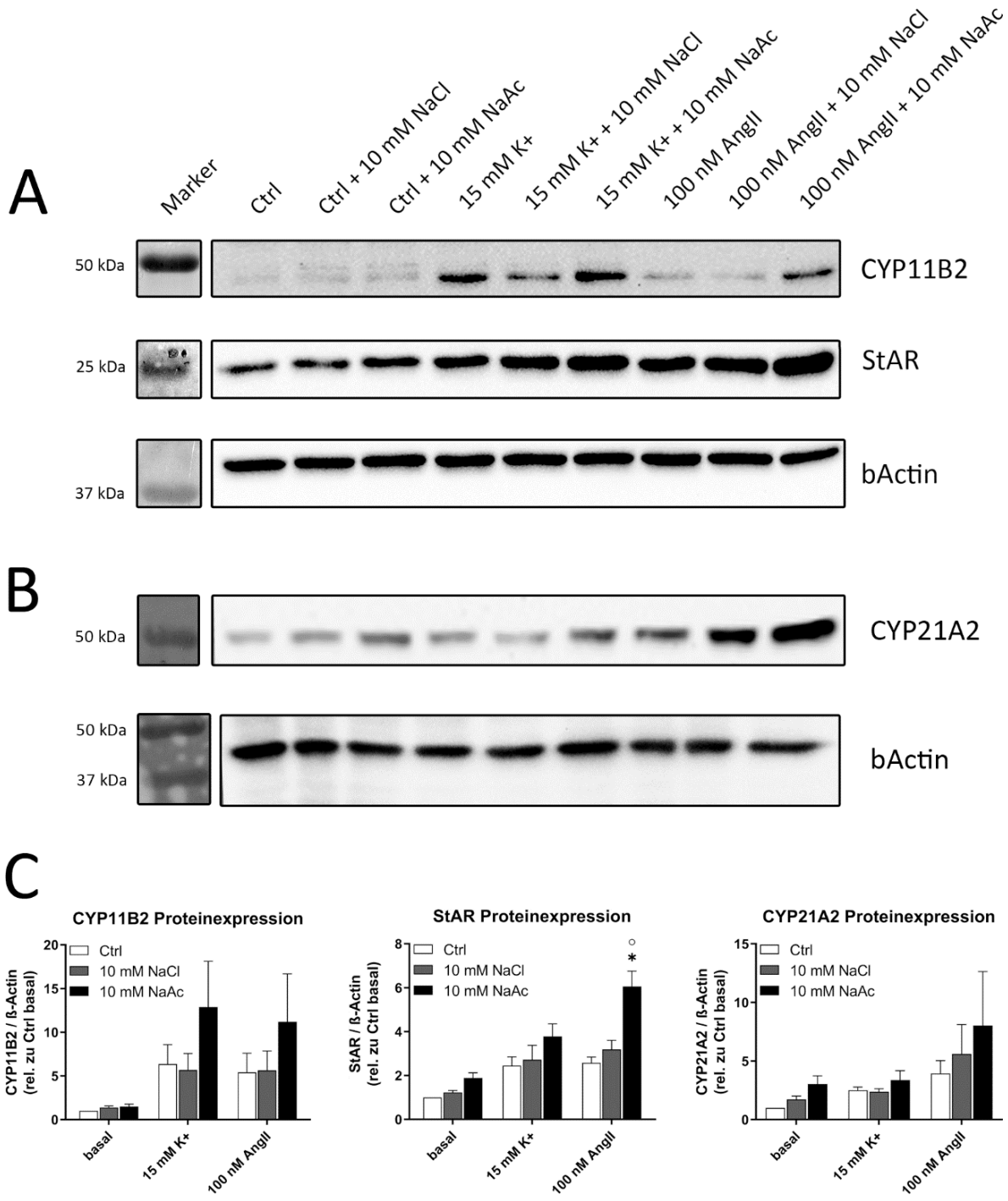


Abbildung 25: ***Proteinexpression von Aldosteronsynthase (CYP11B2), StAR-Protein und 21-Hydroxylase (CYP21A2) in NCI-Zellen, stimuliert mit 15 mM K^+ bzw. 100 nM Ang II bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc.*** *10 mM NaCl dienten als Osmolaritätskontrolle. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot bestimmt. Aufgetragen wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein. ß-Actin diente als Referenzprotein. (A) Gezeigt sind repräsentative Blots für CYP11B2 und STAR. (B) Gezeigt ist ein repräsentativer Blot für CYP21A2. (C) Die Signale der Western Blots wurden mit der Image Studio Lite-Software der Firma LI-COR quantifiziert und die Werte auf die Expression von ß-Actin normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte ±SEM, normalisiert auf den basalen Kontrollwert der unstimulierten Zellen. Für CYP11B2 und STAR wurden n = 8, für CYP21A2 n=4 Ansätze quantifiziert. * bedeutet p < 0,05 im Vergleich von K^+ bzw. Ang II zu basal. ○ bedeutet p < 0,05 im Vergleich von NaAc zu Ctrl.*

3.2.7 Vorläufige Untersuchungen der Proteinexpression der bei der Proteomanalyse ausgewählten Kandidaten

Weiterhin wurde damit begonnen, die Proteinexpression der ausgewählten Kandidaten mittels Western Blot zu untersuchen, um so die Ergebnisse der Proteomanalyse mit einer weiteren Methode an unabhängigen Proben zu verifizieren. Da dazu bisher allerdings erst einzelne Western Blots durchgeführt wurden, handelt es sich bei den im Folgenden gezeigten Daten nur um vorläufige Ergebnisse.

CIP2A wird unter 15 mM K^+ und 100 nM Ang II-Stimulation verstärkt exprimiert, allerdings führt NaAc hier zu einem Rückgang der Expression (vgl. Abbildung 26A, oben). Für CTTNBP2NL konnte kein geeigneter Antikörper gefunden werden. Stattdessen untersucht wurde die Expression der katalytischen Untereinheit der Protein Phosphatase 2A (PPP2CA), mit der CTTNBP2NL interagiert. Dessen Expression war insgesamt recht ausgeglichen. Dennoch scheint NaAc unter Ang II-Stimulation zu einem leichten Rückgang der PPP2CA-Expression zu führen (vgl. Abbildung 26A, Mitte). Bei APOO handelt es sich um ein Protein, dass sowohl unglykosyliert als auch glykosyliert vorliegen kann. An der Bildung des MICOS-Komplexes ist nur die unglykosylierte Form beteiligt (Koob et al. 2015). In den NCI-Zellen war diese Form, die eine Größe von 22 kDa hat, jedoch nicht detektierbar. Stattdessen zeigten sich prominente Banden zwischen 50 kDa und 75 kDa. Da die glykosylierte Form 55 kDa groß sein soll, wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den gefundenen Banden um ebenjene Form handelt. Dabei erscheint diese Bande in den Kalium- und den Ang II-stimulierten Zellen schwächer, wenn gleichzeitig mit NaCl oder NaAc behandelt wurde. Es handelt sich also möglicherweise um einen Osmolaritätseffekt. In den Proteomdaten hingegen führte NaAc unter Ang II zu einer verstärkten APOO-Expression. Möglicherweise liegt dieses unterschiedliche Verhalten daran, dass im Western Blot die glykosylierte anstelle der unglykosylierten Form detektiert wurde (vgl. Abbildung 26B, oben). Die Glycerolkinase GK hingegen wurde in allen Gruppen annähernd gleich stark exprimiert (vgl. Abbildung 26B, 2. v. oben). Die Expression von KCNJ5 war in den Kontrollzellen und den mit 15 mM K^+ stimulierten Zellen durch NaAc leicht verringert. In den Ang II-stimulierten Zellen hingegen führte NaAc zu einem deutlichen Rückgang der KCNJ5-Expression (vgl. Abbildung 26B, 2. v. unten).

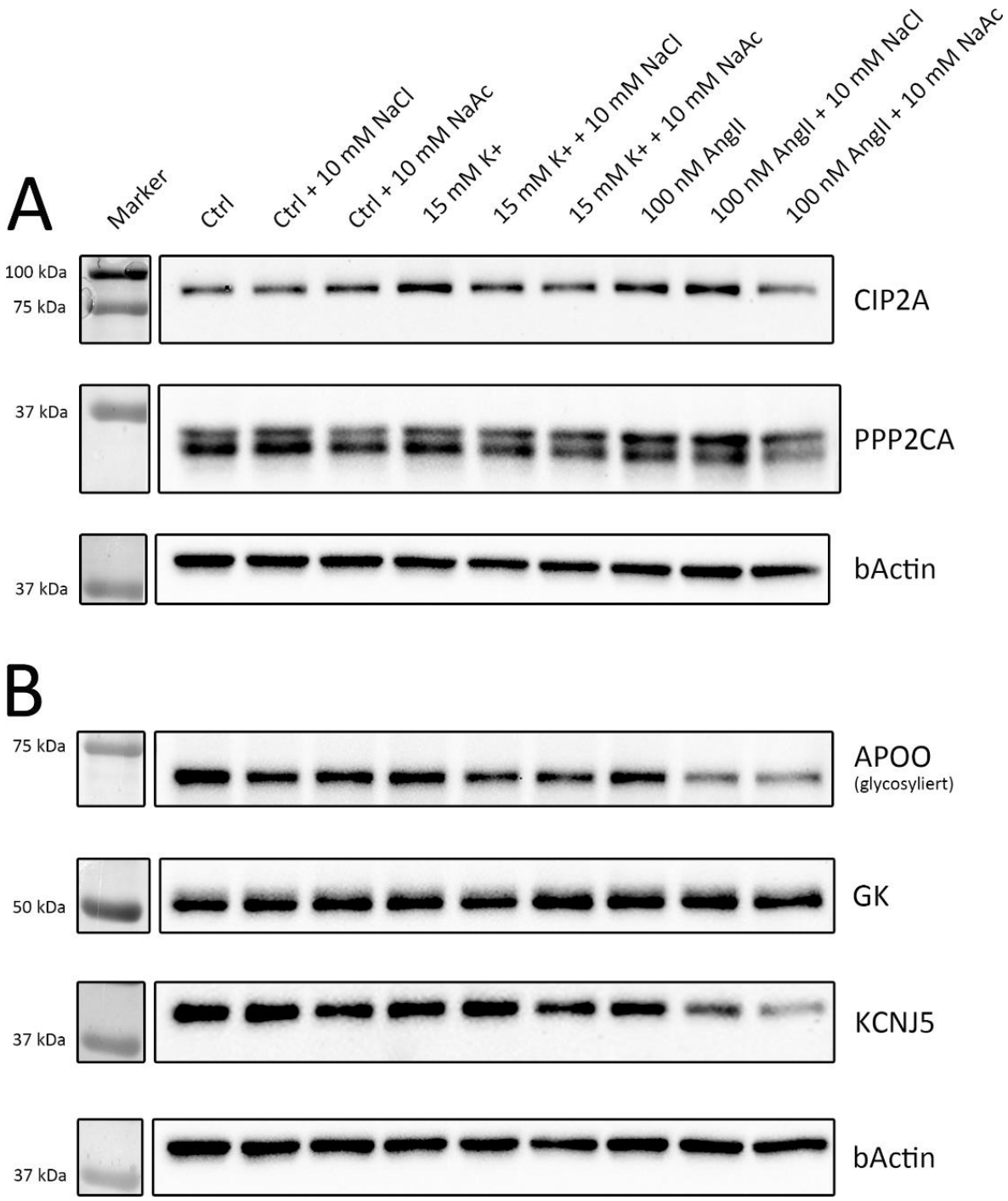


Abbildung 26: ***Proteinexpression von CIP2A und PPP2CA (A) sowie von APOO, GK und KCNJ5 (B) in NCI-Zellen, stimuliert mit 15 mM K^+ bzw. 100 nM Ang II bei gleichzeitiger Behandlung mit NaAc.*** *10 mM NaCl dienten als Osmolaritäts-kontrolle. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot bestimmt. Aufgetragen wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein. ß-Actin diente als Referenzprotein. Gezeigt sind Blots der bisher durchgeführten einzelnen Versuche.*

3.2.8 Zusammenfassung der Untersuchungen zum Einfluss des zellulären pH auf die Aldosteronproduktion

Die Untersuchung, wie der intrazelluläre pH-Wert die Aldosteronproduktion beeinflusst, zeigte zunächst, dass der verstärkende Effekt von NaAc zumindest teilweise Ca^{2+}-vermittelt ist, dass insbesondere in Ang II-stimulierten Zellen aber noch weitere pH-abhängige Signalwege aktiviert sein müssen. Weiterhin wurde deutlich, dass in Ang II-stimulierten NCI-Zellen vor allem die PKD für die Aldosteronsynthese wichtig ist. Dabei nimmt der pH ebenfalls Einfluss, wobei allerdings CYP11B2 eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Vielmehr beeinflusst die PKD die Aldosteronproduktion eher über StAR und CYP21A2. Mittels Proteomanalyse wurde nach Proteinen gesucht, die bisher im Zusammenhang mit Aldosteron unbekannt waren, deren Expression aber durch NaAc beeinflusst wird. Als nächster Schritt muss die Expression der dabei ausgewählten Kandidaten in unabhängigen Experimenten bestätigt werden. Dazu wurden bereits erste Vorversuche durchgeführt, jedoch sind noch weitere Experimente nötig. In weiteren Versuchen müssen anschließend die zugrunde liegenden Mechanismen, wie diese Kandidaten möglicherweise an der Aldosteronsynthese beteiligt sind, entschlüsselt werden.

4 Diskussion

Das Mineralocorticoid Aldosteron wird hauptsächlich in der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde gebildet und ist beim Menschen der wichtigste Regulator des Wasser- und Elektrolythaushalts. Somit ist es auch entscheidend an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Eine Fehlregulation der Aldosteronproduktion kann zu Krankheitsbildern wie dem Primären Hyperaldosteronismus (PA) führen und somit schwere Folgen für den Organismus haben. PA ist durch eine zu hohe, von physiologischen Regulationsmechanismen unabhängige Aldosteronproduktion gekennzeichnet und ist eine der häufigsten Ursachen für sekundären Bluthochdruck. Ein zentraler Vorgang bei der Aldosteronsynthese ist die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. So führen die beiden wichtigsten Stimuli der Aldosteronsynthese – die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration und Angiotensin II (Ang II) – zu einer Depolarisation des Membranpotentials und dadurch zum Calciumeinstrom über spannungsgesteuerte Calciumkanäle. In den letzten Jahren wurden bei Patienten mit PA verschiedene Mutationen in diesen Calciumkanälen nachgewiesen, zunächst im L-Typ Kanal CACNA1D (Azizan et al. 2013; Scholl et al. 2013; Fernandes-Rosa et al. 2014; Nanba et al. 2018), aber auch im T-Typ Kanal CACNA1H (Scholl et al. 2015; Daniil et al. 2016; Nanba et al. 2020). Die Mutation CACNA1H^{M1549V} war dabei die erste Mutation eines T-Typ Calciumkanals, die im Zusammenhang mit PA beschrieben wurde. Die Kanaleigenschaften wurden bisher jedoch nur in nicht-adrenalen Zellen beschrieben (Scholl et al. 2015).

Um die Pathophysiologie von CACNA1H^{M1549V} bei der Entstehung von PA besser verstehen zu können, wurde in dieser Arbeit die Mutation im adrenalen Zellmodell näher charakterisiert und die elektrophysiologischen Eigenschaften, die Entstehung von spontanen Oszillationen des Membranpotentials, die Na^+-Leitfähigkeit sowie der Einfluss auf intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration und pH-Wert näher untersucht.

Auch der intrazelluläre pH-Wert nimmt Einfluss auf die Aldosteronsynthese, ohne dass bisher die Mechanismen dahinter genauer bekannt sind. Daher wurde in dieser Arbeit weiterhin erforscht, über welche Signalwege der pH-Wert die Aldosteronproduktion beeinflusst. Dazu wurden zunächst der Calcium- sowie der PKC- und PKD-Signalweg näher untersucht und anschließend eine Proteomanalyse durchgeführt, um mögliche neue Signalwege zu finden, die bisher nicht mit der Aldosteronsynthese in Verbindung gebracht wurden.

4.1 Charakterisierung von CACNA1H^{M1549V} im adrenalen Zellmodell

Die ersten Mutationen in aldosteronproduzierenden Adenomen (APA) wurden im Gen KCNJ5 gefunden (Choi et al. 2011). Seitdem wurden bei PA-Patienten viele weitere Mutationen in unterschiedlichen Genen gefunden. Viele davon wurden anschließend funktionell charakterisiert. Bei einigen Mutationen konnte dabei ein Zusammenhang zu einer erhöhten Aldosteronproduktion hergestellt werden. Bei anderen wiederum, beispielsweise der CACNA1D-Variante M1354I (Azizan et al. 2013), stellte sich im Nachhinein heraus, dass sie wohl nicht pathogen sind (Pinggera et al. 2018). Eine Reihe von APA-Mutationen hingegen wurde bisher noch nicht näher funktionell charakterisiert.

Die hier beschriebene Mutation CACNA1H^{M1549V} wurde zunächst bei fünf nicht miteinander verwandten Kindern mit Bluthochdruck und PA gefunden (Scholl et al. 2015). In diesem Zusammenhang erfolgte auch eine erste elektrophysiologische Charakterisierung des mutierten Kanals in nicht adrenalen HEK293T-Zellen. Eine erste Studie zum Einfluss der Mutation auf die Aldosteronproduktion und die CYP11B2-Expression zeigte, dass CACNA1H^{M1549V} in der verwendeten adrenalen HAC15-Zelllinie zu einer deutlichen Erhöhung der untersuchten Parameter führt (Reimer et al. 2016). Zusätzlich wurde kürzlich eine Studie an Knock-in-Mäusen veröffentlicht, welche die entsprechende Mutation (die homologe Position in der Maus ist Cacna1h^{M1560V}) trugen (Seidel et al. 2021). Die Mäuse zeigten dabei nur leicht erhöhte Aldosteronspiegel, aber dennoch eine Erhöhung des Blutdrucks. Zusätzlich war die intrazelluläre Ca^{2+}-Aktivität in den Glomerulosazellen dieser Mäuse erhöht (Seidel et al. 2021). Insgesamt war der Phänotyp der Mäuse jedoch deutlich milder als bei den beschriebenen Patienten. Dennoch deuten die bisherigen Versuche darauf hin, dass die CACNA1H^{M1549V}-Mutation ursächlich für die Entstehung von PA ist.

4.1.1 Veränderte elektrophysiologische Eigenschaften des mutierten CACNA1H

Bei Patienten mit aldosteronproduzierendem Adenom (APA) wurde bisher eine CACNA1H-Mutation (I1430T) gefunden (Nanba et al. 2020), wobei die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Mutation noch nicht näher beschrieben sind. Zusätzlich wurden fünf Keimbahnmutationen (S196L, M1549V, M1549I, V1951E und P2083L) beschrieben und auch elektrophysiologisch charakterisiert, allerdings ausschließlich in nicht-adrenalen Zellmodellen (Scholl et al. 2015; Daniil et al. 2016). Dabei zeigten die Zellen mit mutiertem Kanal Veränderungen bei der Aktivierung und Inaktivierung. Der am deutlichsten ausgeprägte Effekt der Mutante CACNA1H^{M1549V} ist eine verzögerte Inaktivierung während einer anhaltenden Depolarisation (Scholl et al. 2015). Dies scheint

naheliegend, da die Mutation in einem hochkonservierten Bereich liegt, der an der Regulation der Inaktivierung beteiligt ist (Marksteiner et al. 2001). Zusätzlich aktivierten die Zellen, welche die Mutante exprimierten, bereits bei geringerer Depolarisation (Scholl et al. 2015). Allerdings war diese Verschiebung nur gering, sodass es unwahrscheinlich erschien, dass bei dem hyperpolarisierten Membranpotential von nativen Glomerulosazellen eine ausreichende Aktivierung des Kanals erfolgt.

In Zellen der adrenalen Zelllinie NCI-H295R hingegen aktivierten sowohl der Wildtyp-Kanal als auch die CACNA1H^{M1549V}-Mutante bereits bei stärker hyperpolarisiertem Membranpotential als dies in den nicht-adrenalen Zellen der Fall war (vgl. Abbildung 7). Dadurch war die Mutante bereits im Bereich des hyperpolarisierten Ruhemembranpotentials von nativen Glomerulosazellen aktiv. Diese Verschiebung der Aktivierung des mutierten Kanals könnte erklären, wie es bei Patienten, welche die CACNA1H^{M1549V}-Mutation tragen, zu einer von zusätzlichen Stimulationen autonomen Aldosteronproduktion kommt. Die hier beschriebenen unterschiedlichen Ergebnisse in NCI-Zellen können auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein. Zum einen können zellspezifische Unterschiede dafür verantwortlich sein. Nebennierenzellen exprimieren – anders als beispielsweise HEK293T-Zellen – eine Reihe weiterer Kanäle und Transporter. Diese sind für die Physiologie dieser Zellen nötig, indem sie unter anderem das Membranpotential und die Ca^{2+}-Aktivität regulieren und dadurch die korrekte Funktion der Zelle beeinflussen. Dies zeigt sich auch daran, dass bei Versuchen in CHO-Zellen (vgl. Abbildung 8) trotz ansonsten identischer Bedingungen die Maxima der transienten Einwärtsströme bei einem stärker depolarisiertem Membranpotential lagen als bei den Versuchen in NCI-Zellen. Weiterhin wurde bereits in anderen Fällen berichtet, dass sich die elektrophysiologischen Eigenschaften von CACNA1H und anderen spannungsgesteuerten Calciumkanälen Zelllinien-abhängig unterscheiden können (Tottene et al. 2002; Souza et al. 2016).

Des Weiteren wurden bei den hier beschriebenen Versuchen physiologische Lösungen verwendet, um die Funktion der weiteren Transporter und Kanäle nicht zu beeinflussen. In den bisherigen Untersuchungen zur CACNA1H^{M1549V}-Mutante wurden die Patch Clamp Experimente mit Lösungen durchgeführt, die eine unphysiologisch hohe Ca^{2+}-Konzentration (5 mM), aber keine Na^{+}-Ionen enthielten. Außerdem wurden dabei K^{+}-Ströme gehemmt (Scholl et al. 2015). Derartige Bedingungen werden normalerweise verwendet, um spannungsabhängige Ca^{2+}-Ströme besser messen zu können. Allerdings gibt es Studien, die zeigen, dass die Spannungsabhängigkeit von T-Typ Calciumkanälen von der Ca^{2+}-Konzentration abhängig ist und dass eine erhöhte Ca^{2+}-Konzentration dazu führt, dass die Kanäle erst bei stärker depolarisiertem Membranpotential aktivieren (Fukushima und Hagiwara 1985; Quinn et al. 1992). Zusätzlich spielt das Vorhandensein von Na^{+}-Ionen in der Lösung eine Rolle, da T-Typ Calciumkanäle – anders als L-Typ Kanäle – zu einem gewissen

Anteil auch Na^+-Ionen leiten (Matsuda 1986; Lux et al. 1990; Stephens et al. 2015). Die Lösungen, die bei den hier gezeigten Versuchen verwendet wurden, enthielten sowohl K^+- als auch Na^+-Ionen, sowie eine physiologische Ca^{2+}-Konzentration von 1,3 mM. Für die hier beschriebene Verschiebung der Aktivierung von CACNA1H spielen also vermutlich sowohl zelllinienspezifische Effekte als auch die Ionenzusammensetzung der extrazellulären Lösung eine Rolle.

4.1.2 Induktion von Membranpotentialoszillationen durch CACNA1H^{M1549V}

Es wird vermutet, dass Oszillationen des Membranpotentials eine wichtige Rolle bei der Regulation der Aldosteronproduktion *in vivo* spielen (Hu et al. 2012). Allerdings ist es schwierig, deren Funktion genauer zu charakterisieren, da sowohl primärkultivierte Nebennierenzellen als auch adrenale Zelllinien normalerweise keine Oszillationen aufweisen. Diese wurden bisher nur in frisch präparierten Nebennierenschnitten beschrieben (Hu et al. 2012). Durch die Überexpression von CACNA1H^{M1549V} kam es in NCI-Zellen jedoch ebenfalls zur Entstehung spontaner Oszillationen des Membranpotentials (vgl. Abbildung 9 und Abbildung 10). Im Gegensatz dazu traten Oszillationen bei den Zellen, die CACNA1H^{WT} exprimierten, nur vereinzelt auf.

Eine Voraussetzung für die Entstehung von Oszillationen bei den hier beschriebenen Patch Clamp-Versuchen war jedoch, dass das basale Membranpotential der Zellen durch konstante Strominjektion hyperpolarisiert werden musste. In Nebennierenschnitten traten Oszillationen nur bei Membranpotentialen im Bereich von -87 bis -77 mV auf (Hu et al. 2012). In den meisten der hier untersuchten Zellen, die entweder CACNA1H^{WT} oder CACNA1H^{M1549V} überexprimierten, war das basale Membranpotential jedoch deutlich positiver (vgl. Abbildung 7C). Dies verhinderte vermutlich das Auftreten von Oszillationen unter Kontrollbedingungen. Eine Reihe von Faktoren könnte für diese Depolarisation der Zellen verantwortlich sein. Zum einen könnte die Pipettenlösung nach dem Einreißen der Zelle die Ionenzusammensetzung des Zytosols beeinflussen und dadurch beispielsweise die Aktivität der endogenen Kaliumkanäle hemmen. Zum anderen könnte die Überexpression des Kanals dazu führen, dass ein dauerhafter depolarisierender *window current* vorhanden ist. Unter *window current* versteht man dabei einen kleinen Spannungsbereich, bei dem die Kanäle öffnen können, aber nicht vollständig inaktivieren. Dies hat zur Folge, dass bei diesen Spannungen dauerhaft ein kleiner Teil der Kanäle offen ist (Crunelli et al. 2005). Außerdem könnte für das depolarisierte Membranpotential auch das Fehlen anderer Faktoren, beispielsweise die elektrische Kopplung zu den Nachbarzellen, verantwortlich sein. Die Kompensation dieser Depolarisation durch konstante Strominjektion führte indessen in den Zellen, die CACNA1H^{M1549V} exprimierten, zu starken Oszillationen des Membranpotentials. Grund dafür dürfte die unnatürlich

starke Aktivierung der Mutante bei stärker hyperpolarisiertem Membranpotential sein (vgl. Abbildung 7). Der dabei entstehende Strom könnte dann gewissermaßen als Schrittmacherstrom zur Depolarisation führen und so die Entstehung und Frequenz von Membranpotentialoszillationen beeinflussen. Zwar tragen T-Typ Calciumkanäle indirekt auch zur Repolarisation bei, indem durch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration auch die Aktivität Ca^{2+}-abhängiger Kaliumkanäle gesteigert wird (Vergara et al. 1998). Dennoch war die Repolarisation bei den mit mutiertem CACNA1H transfizierten Zellen langsamer. Dadurch waren die einzelnen Peaks insgesamt breiter als bei den vereinzelten Zellen mit $CACNA1H^{WT}$, die ebenfalls Oszillationen zeigten. Eine mögliche Erklärung für diese verbreiterten Peaks könnte sein, dass die verlangsamte Inaktivierung von $CACNA1H^{M1549V}$ und der dadurch höhere Einstrom positiv geladener Ca^{2+}-Ionen der Repolarisation durch Ca^{2+}-abhängige Kaliumkanäle zunächst entgegenwirken.

Ähnliche Vorgänge wie hier beschrieben könnten auch in den Glomerulosazellen von Patienten mit mutiertem CACNA1H zu vermehrten Membranpotentialoszillationen führen, was wiederum die autonome Aldosteronproduktion anregen könnte. Dabei dürften die einzelnen Effekte bei den Patienten weniger stark ausgeprägt sein, da sie nur ein mutiertes CACNA1H-Allel tragen, während die hier beschriebenen Experimente an Zellen durchgeführt wurden, welche CACNA1H überexprimierten. Andererseits dürfte bei den Patienten das Membranpotential der Glomerulosazellen dafür weniger stark depolarisiert sein, was die Entstehung von oszillatorischen Änderungen des Membranpotentials eher begünstigen sollte und damit zu einer autonomen Aldosteronproduktion führen könnte.

4.1.3 Mögliche Rolle einer teilweisen Na^+-Leitfähigkeit von CACNA1H bei der Aldosteronsynthese

In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass bei ca. 25 % des Stroms von CACNA1H die Ladungsträger nicht Ca^{2+}, sondern Na^+-Ionen sind (Stephens et al. 2015). Daneben spielt eine abnormale Na^+-Leitfähigkeit eine wichtige Rolle für den Phänotyp von Mutationen in anderen Kanälen und Transportern, die im Zusammenhang mit PA stehen (Choi et al. 2011; Tauber et al. 2016). Deshalb wurde hier untersucht, ob die physiologische Na^+-Leitfähigkeit der T-Typ Calciumkanäle ebenfalls an der Pathogenese beteiligt ist. Die Na^+-Permeabilität von CACNA1H wird dabei durch die Stärke der Ca^{2+}-Bindung innerhalb der Kanalpore bestimmt (Tang et al. 2014; Shuba 2014). Theoretisch können die Ca^{2+}-Bindungsstellen des Kanals auch von Na^+-Ionen besetzt werden. Allerdings ist die Affinität der Bindungsstellen zu Ca^{2+} normalerweise deutlich stärker. Ob die $CACNA1H^{M1549V}$-Mutation dabei die Ca^{2+}-Affinität beeinflusst, ist nicht bekannt. Die mutierte Stelle liegt in der

Transmembrandomäne IIIS6 und damit eigentlich außerhalb des Selektivitätsfilters (Marksteiner et al. 2001; Hering et al. 2018). Allerdings kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass über Konformationsänderungen der S6-Domäne durch die Mutation auch die Ca^{2+}-Bindung beeinflusst wird. In Ca^{2+}-freier Lösung zeigten die mit der Mutante transfizierten Zellen einen signifikanten Na^+-Einwärtsstrom, während dies bei den Zellen mit $CACNA1H^{WT}$ nicht der Fall war (vgl. Abbildung 13). Da bei der Ca^{2+}-freien Lösung jedoch lediglich Ca^{2+} durch Na^+ ersetzt worden war, aber keine zusätzlichen Chelatoren wie EGTA enthalten waren, könnten noch Spuren von Ca^{2+} zurückgeblieben sein. Diese könnten möglicherweise dafür verantwortlich sein, dass der Na^+-Strom in den Wildtyp-Zellen gehemmt war, während die Mutanten-Zellen darauf weniger empfindlich reagierten. Zwar war in physiologischer Lösung, die sowohl Na^+ (145 mM) als auch Ca^{2+} (1,3 mM) enthielt, der Anteil des Na^+-Stroms zwischen Mutanten- und Wildtypzellen nicht unterschiedlich (vgl. Abbildung 13). Jedoch tritt aufgrund der Aktivierung des mutierten Kanals bei bereits stärker hyperpolarisiertem Membranpotential auch der Na^+-abhängige Strom bereits früher auf. Deshalb könnte die Na^+-Permeabilität von $CACNA1H^{M1549V}$ in Nebennierenzellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Membranpotentialoszillationen spielen, indem sie zur Depolarisation zu Beginn der Oszillationen beiträgt. Dies wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass die Häufigkeit von Oszillationen der Mutanten-Zellen in Na^+-freier Lösung abnahm und das basale Membranpotential stärker hyperpolarisiert war als unter Kontrollbedingung in der Anwesenheit von Na^+-Ionen (vgl. Abbildung 14). Weiterhin wird die Vermutung, dass der Na^+-Strom in NCI-Zellen mit $CACNA1H^{M1549V}$ eine wichtige Rolle spielt, dadurch unterstützt, dass unter Na^+-freien Bedingungen in diesen Zellen auch die ungewöhnlich hohe intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration verringert war und weniger Oszillationen der Ca^{2+}-Aktivität auftraten (vgl. Abbildung 17). Der Einfluss von CACNA1H auf die Ca^{2+}-Aktivität wird weiter unten näher diskutiert. Um die physiologische Bedeutung der Na^+-Leitfähigkeit von $CACNA1H^{WT}$ auf das Membranpotential von Glomerulosazellen näher zu untersuchen, sind weitere Experimente nötig. Zusätzlich könnte die hier gefundene Na^+-abhängige Aktivität von CACNA1H auch bei der Pathophysiologie anderer Krankheiten, die im Zusammenhang mit CACNA1H-Mutationen stehen, wie beispielsweise Epilepsie (Vitko et al. 2005), eine Rolle spielen.

4.1.4 Temperaturunabhängige Effekte von $CACNA1H^{M1549V}$

Die hier gezeigten Patch Clamp Experimente wurden zunächst bei Raumtemperatur durchgeführt. Dadurch konnten die Resultate besser mit den Ergebnissen der anderen Arbeitsgruppen verglichen werden, welche die bisher im Zusammenhang mit PA gefundenen CACNA1H-Mutationen ebenfalls bei Raumtemperatur elektrophysiologisch charakterisierten (Scholl et al. 2015; Daniil et al. 2016).

Zusätzlich war aus früheren Projekten mit NCI-Zellen bekannt, dass es bei diesen Zellen schwieriger ist, Patch Clamp-Messungen bei 37°C über längere Zeit stabil zu halten. Die Calcium-Messungen mit Fura-2 hingegen wurden bei 37°C durchgeführt, da hier die technische Umsetzung einfacher war. Allerdings wurde beschrieben, dass die Aktivität von CACNA1H von der Temperatur abhängig ist und sich beispielsweise die Kinetik von Aktivierung und Inaktivierung bei 37°C deutlich beschleunigt (Iftinca et al. 2006). Um mögliche Einflüsse der Messtemperatur auf den Phänotyp von Zellen mit $CACNA1H^{M1549V}$ bzw. Wildtyp-CACNA1H zu überprüfen, wurden entsprechend jeweils einige Patch Clamp Experimente bei 37°C und Ca^{2+}-Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Temperatur sowohl bei den Wildtyp-, als auch bei den Mutanten-Zellen weder Einfluss auf die spannungsabhängigen Ströme noch auf das basale Membranpotential hat (vgl. Abbildung 11A&B). Allerdings war in den Messungen bei 37°C die Kinetik von Aktivierung und Inaktivierung im Vergleich zu den Versuchen bei Raumtemperatur deutlich beschleunigt, was mit den von Iftinca et al. beschriebenen Daten übereinstimmt (vgl. Abbildung 11C). Dennoch inaktivierten auch bei 37°C die mutierten Kanäle signifikant langsamer als die Wildtyp-Kanäle. Auch die Entstehung von Membranpotentialoszillationen in den Zellen, die $CACNA1H^{M1549V}$ exprimierten, war in den Messungen bei 37°C ähnlich wie bei Raumtemperatur (vgl. Abbildung 12). Lediglich die Amplitude der einzelnen Peaks erschien etwas geringer. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die insgesamt schnellere Inaktivierung der Kanäle bei 37°C sein. Insgesamt jedoch lässt sich festhalten, dass die Temperatur in Bezug auf das Membranpotential und die Spannungsabhängigkeit des Einwärtsstroms keinen entscheidenden Einfluss auf den Phänotyp der Nebennierenzellen mit mutiertem CACNA1H hat. Sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 37°C traten ähnliche Oszillationen des Membranpotentials auf, auch wenn die Inaktivierung bei 37°C schneller war.

Auch bei den Calcium-Messungen zeigte sich, dass bei Raumtemperatur die basale Ca^{2+}-Aktivität in den Zellen, die mit der Mutante transfiziert waren, im Vergleich zu den Wildtyp- und Kontrollzellen ähnlich stark erhöht war (vgl. Abbildung 15) wie in den Vorversuchen bei 37°C (vgl. Imminger (2016) und Abbildung 28). Allerdings zeigten bei Raumtemperatur insgesamt weniger der mit $CACNA1H^{M1549V}$ transfizierten Zellen Oszillationen der Ca^{2+}-Aktivität. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Aktivität des energieabhängigen Ca^{2+}-Exports bei Raumtemperatur geringer war. Dadurch würde der erhöhte Ca^{2+}-Einstrom schlechter kompensiert, was zur stabiler erhöhten Ca^{2+}-Aktivität in den Mutanten-Zellen führen könnte.

Es lässt sich also sagen, dass sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 37°C bei den Patch Clamp Experimenten und den Fura-2-Messungen deutliche Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp auftraten. Dies lässt den Schluss zu, dass die CACNA1H-Mutation unabhängig von der Temperatur die Aktivität des Kanals verändert und dies wiederum zu Störung des Calciumhaushalts führt. Ein

Vergleich der elektrophysiologischen Eigenschaften mit den Ergebnissen der Ca^{2+}-Messungen ist also trotz der unterschiedlichen Messtemperaturen durchaus möglich.

4.1.5 Zusammenhang zwischen abnormaler Kanalaktivität von CACNA1H und verändertem Ca^{2+}-Stoffwechsel

Die elektrophysiologischen Messungen an NCI-Zellen zeigten, dass die $CACNA1H^{M1549V}$-Mutante bereits im Bereich des Ruhemembranpotentials von Glomerulosazellen aktiv ist. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass dies zu einem deutlichen Anstieg der basalen Ca^{2+}-Aktivität in Zellen mit der Mutante führt (vgl. Imminger (2016) und Abbildung 28). Zusätzlich fanden sich dabei in den Mutanten-Zellen auch oszillatorische Änderungen der Ca^{2+}-Aktivität, welche mit steigender extrazellulärer K^+-Konzentration zunächst abnahmen und schließlich ganz verschwanden. Auch die Membranpotentialoszillationen in den Patch Clamp Experimenten wurden bei steigender K^+-Konzentration zunächst weniger und verschwanden schließlich (vgl. Abbildung 10). Im Gegensatz dazu hatten Zellen, die mit $CACNA1H^{WT}$ transfiziert waren, keine signifikant erhöhten basalen Ca^{2+}-Level und zeigten auch nur vereinzelt Ca^{2+}-Oszillationen. Dies scheint auch plausibel, da der Wildtyp-Kanal im Bereich des Ruhemembranpotentials von NCI-Zellen nur eine geringe Aktivität zeigt. Zur erhöhten Ca^{2+}-Aktivität in Zellen, die die Mutante exprimierten, tragen vermutlich mehrere Faktoren bei. Zum einen kommt es durch den mutieren Kanal zu einem längeren Ca^{2+}-Einstrom, da er bereits bei geringer hyperpolarisiertem Membranpotential aktiviert, anschließend jedoch langsamer inaktiviert. Zum anderen führt die wiederholende Depolarisation während den Oszillationen dazu, dass weitere endogene spannungsabhängige Calciumkanäle (T-Typ und L-Typ Kanäle) aktiviert werden. Andererseits stellt sich die Frage, warum die basale Depolarisation von Zellen mit $CACNA1H^{WT}$ nicht ebenfalls zu einem Anstieg der Ca^{2+}-Aktivität führt. So könnte man erwarten, dass durch die Depolarisation auch in diesen Zellen L-Typ Calciumkanäle aktiviert werden. Allerdings traten in Zellen, die den Wildtyp überexprimierten, nur vereinzelt Oszillationen auf. Diese sind aber vermutlich entscheidend für die erneute Aktivierbarkeit der Calciumkanäle, welche bei anhaltender Depolarisation inaktivieren. Außerdem könnte ein gesteigerter Ca^{2+}-Efflux in Zellen mit $CACNA1H^{WT}$ einen erhöhten Ca^{2+}-Einstrom kompensieren, während dies in Zellen mit der Mutante nicht mehr ausreicht.

Um die Frage zu klären, ob die erhöhten Ca^{2+}-Level der mutierten Zellen tatsächlich aus der veränderten Aktivität von CACNA1H resultieren, wurde bei einigen der Fura-2-Messungen der Kanal durch Mibefradil, einen T-Typ spezifischen Calciumkanalinhibitor (Rossier et al. 1998; Martin et al. 2000), gehemmt (vgl. Abbildung 16). Dabei zeigte sich ein deutlicher Abfall der Ca^{2+}-Aktivität in den

mit CACNA1H^{M1549V} transfizierten Zellen. Dennoch lag die Ca^{2+}-Aktivität dabei trotz Hemmung von CACNA1H noch immer höher als unter denselben Bedingungen in den Wildtyp überexprimierenden Zellen. Ursache dafür könnte sein, dass der Inhibitor den Kanal möglicherweise nicht vollständig hemmte oder noch weitere, unspezifische Effekte hatte. Eine andere Erklärung wäre, dass neben der gesteigerten Aktivität von CACNA1H noch weitere Faktoren für die hohen Ca^{2+}-Level in den Mutanten-Zellen verantwortlich sind. So könnte es beispielsweise durch die stärkere Depolarisation zu einer gestörten Funktion des Na^+/Ca^{2+}-Austauschers (NCX) kommen, was einen geringeren Ca^{2+}-Export zur Folge hätte oder sogar zur Umkehr der NCX-Funktion und damit zum zusätzlichen Ca^{2+}-Import führen könnte. Auch der intrazelluläre Ca^{2+}-Transport sowie die Pufferkapazität Ca^{2+}-bindender Proteine spielen eine Rolle. Das komplexe Zusammenspiel dieser Faktoren ist vermutlich auch dafür verantwortlich, dass sich die Oszillationen des Membranpotentials nicht eins-zu-eins in den Ca^{2+}-Oszillationen widerspiegeln. Dennoch zeigen die Experimente mit Mibefradil, dass für die erhöhte Ca^{2+}-Konzentration hauptsächlich die veränderte Aktivität von CACNA1H^{M1549V} verantwortlich ist.

4.1.6 Änderungen der Ca^{2+}-Aktivität unter Na^+-freien Bedingungen

Wie oben bereits diskutiert, spielt die partielle Na^+-Permeabilität von CACNA1H^{M1549V} eine mögliche Rolle für die Pathophysiologie des mutierten Kanals. CACNA1H^{M1549V} aktiviert bereits bei stärker hyperpolarisiertem Membranpotential. Dadurch treten in diesem Bereich auch Na^+-Ströme auf, welche möglicherweise für die Entstehung der Membranpotentialoszillationen verantwortlich sind. In der Folge werden weitere spannungsgesteuerte Ca^{2+}-Kanäle aktiviert, wodurch es zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration sowie zur Entstehung von Ca^{2+}-Oszillationen kommt. Bei Fura-2-Messungen in Na^+-freier Lösung kam es in den Zellen, die mit CACNA1H^{M1549V} transfiziert waren, zu einer Erniedrigung der basal erhöhten Ca^{2+}-Aktivität. Ebenso verschwanden die Ca^{2+}-Oszillationen (vgl. Abbildung 17). Da unter Na^+-freien Bedingungen auch die Anzahl an Membranpotentialoszillationen geringer wurde (vgl. Abbildung 14), wurden dadurch weniger andere spannungsgesteuerte Ca^{2+}-Kanäle aktiviert und weniger Ca^{2+} konnte in die Zellen strömen. Andererseits führt das Fehlen von Na^+-Ionen zu einer Hemmung des NCX bzw. sogar zur Umkehr von dessen Funktion, sodass es statt zum Ca^{2+}-Export zum Import kommen kann (Blaustein und Lederer 1999). In den Zellen, die CACNA1H^{WT} exprimierten, und in den Kontrollzellen dürfte dieser Effekt des NCX dominieren, weshalb es in diesen Zellen unter Na^+-freien Bedingungen zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Aktivität kommt. Da der Wildtyp-Kanal beim hyperpolarisierten Ruhemembranpotential von Glomerulosazellen nicht aktiv ist, gibt es dabei auch keinen Na^+-Strom, der durch die Entfernung von Na^+ aus der extrazellulären Lösung beeinflusst werden könnte. In den

Mutanten-Zellen dagegen treten beide Phänomene auf: zum einen führt die geringere Depolarisation und das Ausbleiben der Oszillationen zu einem geringeren Ca^{2+}-Einstrom durch spannungsaktivierte Ca^{2+}-Kanäle. Zum anderen wird zeitgleich durch den NCX weniger Ca^{2+} exportiert bzw. Ca^{2+} sogar importiert. Offensichtlich überwiegt jedoch der erste Effekt, weshalb es unter Na^+-freien Bedingungen in den $CACNA1H^{M1549V}$ exprimierenden Zellen auch zu einem Abfall der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration kommt. Dabei bleibt die Ca^{2+}-Aktivität der Mutanten-Zellen jedoch auf einem ähnlichen Niveau wie unter denselben Bedingungen in den Wildtyp- und Kontrollzellen, da die veränderte Aktivität des NCX einem weiteren Ca^{2+}-Abfall entgegenwirkt.

Eine weitere Überlegung war, ob der Abfall der Ca^{2+}-Aktivität in $CACNA1H^{M1549V}$ exprimierenden Zellen unter Na^+-freien Bedingungen möglicherweise mit Veränderungen des intrazellulären pH-Werts zusammenhängt. Einer der wichtigsten Regulatoren des intrazellulären pH ist der Na^+/H^+-Austauscher (NHE), der den Natriumgradienten nutzt, um Protonen aus der Zelle zu transportieren (Aronson 1985). So wurde an Glomerulosazellen von Ratten gezeigt, dass es unter Na^+-freien Bedingungen zu einer Ansäuerung kommt, da durch die fehlende Triebkraft des NHE weniger Protonen aus den Zellen exportiert werden (Shepherd et al. 1992). Die intrazelluläre Ansäuerung wiederum kann dazu führen, dass spannungsgesteuerte Ca^{2+}-Kanäle, insbesondere L-Typ Kanäle, weniger aktiv sind (Tytgat et al. 1990; Tombaugh und Somjen 1997). pH-Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF zeigten, dass die Zellen, die mit $CACNA1H^{M1549V}$ transfiziert waren, bereits basal saurer waren, und dass es durch die Wegnahme von Na^+ tatsächlich zu einer deutlichen Ansäuerung kommt. Auch in den Wildtypzellen sank der pH, jedoch bei weitem nicht so stark (vgl. Abbildung 18A). Eine mögliche Erklärung für die stärkere Ansäuerung durch $CACNA1H^{M1549V}$ könnte sein, dass durch die basal erhöhte Ca^{2+}-Konzentration möglicherweise die Plasmamembran Ca^{2+}-ATPasen (PMCA) stärker aktiviert werden. Diese transportieren für jedes Ca^{2+}-Ion, das unter ATP-Verbrauch aus der Zelle gepumpt wird, zwei zusätzliche H^+ in die Zelle (Thomas 2009). Da unter Na^+-freien Bedingungen der NCX gehemmt wird, wird die PMCA vermutlich noch stärker aktiviert, sodass noch mehr Protonen importiert werden. Dadurch könnte es zur noch stärkeren Ansäuerung der mit $CACNA1H^{M1549V}$ transfizierten Zellen kommen. Um nun zu überprüfen, ob möglicherweise der intrazelluläre pH-Wert Einfluss auf die Funktion des mutierten Calciumkanals nimmt und die Abnahme der Ca^{2+}-Aktivität unter Na^+-freien Bedingungen eine Folge dieses möglichen Effektes ist, wurden NCI-Zellen gezielt mit 20 mM Natriumacetat (NaAc) angesäuert. Diese Behandlung führte zu einer ähnlich starken Ansäuerung, wie sie in mutierten Zellen in Na^+-freier Lösung zu beobachten war (vgl. Abbildung 18B). Unter der Annahme, dass die Ansäuerung unter Na^+-freien Bedingungen indirekt für den Ca^{2+}-Abfall bei der Mutante ursächlich ist, würde man mit NaAc entsprechend ebenfalls einen Ca^{2+}-Abfall erwarten. Tatsächlich

stieg die Ca^{2+}-Aktivität unter NaAc, trotz Ansäuerung, aber an (vgl. Abbildung 18C). Eine mögliche Ursache dafür könnte ein verminderter Ca^{2+}-Export sein. Einerseits könnte der niedrigere pH bzw. die höhere Protonenkonzentration zu einer verringerten Aktivität der PMCA führen. Andererseits könnte auch hier der NCX wieder eine Rolle spielen. Die höhere H^+-Konzentration führt dabei zu einer verstärkten NHE-Aktivität, was zu einer erhöhten intrazellulären Na^+-Konzentration führt. Dies wiederum führt zu einer verringerten NCX-Aktivität bzw. auch zu einer möglichen Umkehr der Transportrichtung (Blaustein und Lederer 1999). In jedem Fall zeigen die Versuche mit NaAc, dass eine intrazelluläre Ansäuerung eher zu einem Anstieg der Ca^{2+}-Aktivität führt. Daher ist unter Na^+-freien Bedingungen der geringere intrazelluläre pH-Wert nicht die Ursache für den Abfall der Ca^{2+}-Aktivität in CACNA1H^{M1549V} exprimierenden Zellen. Stattdessen sind dafür wohl hauptsächlich die bereits zuvor diskutierten Mechanismen verantwortlich.

4.2 pH-abhängige Regulation der Aldosteronproduktion

Bei manchen der bisher näher untersuchten APA-Mutanten, beispielsweise bei einer Mutation der Na^+/K^+-ATPase, kam es zu einem unphysiologischen Protonen-Leckstrom und infolgedessen zu einer intrazellulären Ansäuerung (Stindl et al. 2015). Daneben ist bereits seit langem bekannt, dass die beiden wichtigsten Stimuli der Aldosteronproduktion – eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration sowie Ang II – ebenfalls den intrazellulären pH beeinflussen (Horiuchi et al. 1989; Conlin et al. 1990; Conlin et al. 1993). Weiterhin wurde gezeigt, dass Veränderungen des extrazellulären pH die Aldosteronsynthese beeinflussen (Kramer et al. 2000). Aber auch eine intrazelluläre Ansäuerung mit 20 mM NaAc führte zu einer Erhöhung der Aldosteronproduktion, allerdings deutlich geringer als eine Stimulation durch Erhöhung der Kaliumkonzentration (Stindl et al. 2015). Andererseits zeigten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, dass NaAc bei gleichzeitiger Stimulation mit Ang II zu einer deutlich verstärkten Aldosteronsynthese führt (Schläger 2017). Dabei muss erwähnt werden, dass 10 mM NaAc nur akut zu einer tatsächlichen Ansäuerung führten, während eine Stimulation für 24 h durch Aktivierung des NHE sogar zu einer Alkalinisierung führte (Schläger 2017). Bei der chronischen Stimulation mit 10 mM NaAc handelt es sich korrekterweise also eher um eine Protonenbeladung, die den NHE aktiviert. Dabei ist unklar, ob bereits die initiale Ansäuerung oder erst spätere indirekte Effekte durch die NHE-Aktivierung für den Einfluss von NaAc auf die Aldosteronproduktion verantwortlich sind. Mit der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, über welche Signalwege der pH-Wert die Aldosteronsynthese beeinflusst.

4.2.1 pH-Einfluss auf den Ca^{2+}-Signalweg

Einer der zentralen Faktoren bei der Regulation der Aldosteronproduktion ist die zytosolische Ca^{2+}-Konzentration. Sowohl eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration als auch Ang II führen zur Depolarisation der Glomerulosazellen, dadurch zum Öffnen von spannungsgesteuerten Calciumkanälen und zum Ca^{2+}-Einstrom aus dem Extrazellularraum. Zusätzlich führt Ang II über die Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) auch noch zur Ca^{2+}-Freisetzung aus dem ER. Durch die erhöhte zytosolische Ca^{2+}-Konzentration werden Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Kinasen (CaMK) aktiviert, welche unter anderem die Expression von CYP11B2 und anderer an der Steroidhormonbiosynthese beteiligter Gene regulieren.

Daher wurde zunächst untersucht, ob die Veränderung des intrazellulären pH den Ca^{2+}-Signalweg beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden einerseits die T-Typ Calciumkanäle durch Mibefradil inhibiert, andererseits wurden CaMK durch KN93 gehemmt. Da die stimulierende Wirkung von Kalium nur darauf beruht, dass es zur Depolarisation der Zelle und dadurch zum Ca^{2+}-Einstrom kommt, ist es durchaus nachvollziehbar, dass beide Inhibitoren jeweils dazu führten, dass die Aldosteronproduktion sowie die CYP11B2-Expression in den K^+-stimulierten Zellen nahezu auf das Niveau der unstimulierten Zellen zurückgingen (vgl. Abbildung 19). Ähnliche Effekte der beiden Inhibitoren wurden bereits früher beschrieben (Pezzi et al. 1996; Rossier et al. 1998). Zusätzlich führten beide Inhibitoren dazu, dass der verstärkende Effekt von NaAc auf Aldosteronsynthese und CYP11B2-Expression ebenfalls nicht mehr vorhanden war. Dies spricht dafür, dass die Effekte des pH-Wert auf die K^+-anhängige Stimulation der Aldosteronproduktion zumindest teilweise über Ca^{2+}-abhängige Wege vermittelt werden. Dabei kann man anhand der Daten jedoch nicht entscheiden, an welcher Stelle des Ca^{2+}-Signalwegs die Wirkung des pH eingreift. Auch die Versuche, die zur Charakterisierung der $CACNA1H^{M1549V}$-Mutante mit NaAc durchgeführt wurden (vgl. Abbildung 18) legen einen Zusammenhang zwischen pH und Ca^{2+}-Aktivität nahe. Zwar erfolgten diese Versuche unabhängig von den eigentlichen Untersuchungen zur pH-Regulation der Aldosteronsynthese und mit einer NaAc-Konzentration von 20 mM (anstatt 10 mM bei den hier beschriebenen Versuchen), dennoch zeigten dabei auch die Kontrollzellen einen Anstieg der Ca^{2+}-Aktivität unter NaAc. Wie bereits oben diskutiert, könnten für den Zusammenhang zwischen pH und Ca^{2+}-Konzentration Veränderungen im Ca^{2+}-Export aufgrund des komplexen Zusammenspiels von NHE, PMCA und NCX verantwortlich sein. Allerdings handelt es sich bei den Versuchen zu $CACNA1H^{M1549V}$ um eine akute Stimulation. Wurden Zellen chronisch (für 24 h) mit Kalium und 10 mM NaAc stimuliert, zeigten sie keine höhere Ca^{2+}-Aktivität als Zellen, die im gleichen Zeitraum nur mit Kalium stimuliert waren (bisher unveröffentlichte Daten). Möglicherweise verstärkt NaAc daher eher die Ca^{2+}-abhängigen Effekte.

Anders als bei den K^+-stimulierten Zellen führten die beiden Inhibitoren in den mit Ang II behandelten Zellen zwar zu einer reduzierten Aldosteronproduktion. Dennoch wurde insbesondere mit KN93 nicht das Niveau der unstimulierten Zellen erreicht (vgl. Abbildung 20A). Auch dies deckt sich mit früheren Studien, die zeigen, dass unter Ang II die Hemmung der Aldosteronsynthese mit Mibefradil oder KN93 immer weniger effektiv war als unter Stimulation mit Kalium (Pezzi et al. 1996; Rossier et al. 1998). Da Zellen, die für 24 h mit Ang II und 10 mM NaAc stimuliert wurden, ebenfalls keine höhere Ca^{2+}-Aktivität zeigten als Zellen, die chronisch nur mit Ang II stimuliert waren (Hünergardt 2018), scheint NaAc auch unter Ang II-Stimulation eher Ca^{2+}-abhängige Effekte zu beeinflussen. Daneben wurde zwar der verstärkende Effekt von NaAc durch die Inhibitoren gesenkt, dennoch war die Aldosteronproduktion der mit Ang II und NaAc stimulierten Zellen trotz Mibefradil und KN93 noch immer höher als in den entsprechenden Zellen ohne NaAc. Dies deutet darauf hin, dass durch den pH-Wert neben dem Ca^{2+}-Signalweg noch andere Wege reguliert werden, welche nur durch Ang II, nicht jedoch durch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration aktiviert werden. Eine Möglichkeit dabei könnte der Angiotensin II-Rezeptor AT_1 selbst sein. So wurde herausgefunden, dass die Signalübertragung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren – zu denen auch AT_1 gehört – pH-abhängig ist (Isom et al. 2013). Durch den veränderten pH könnte also die Aktivität von AT_1 erhöht werden und so zu einer verstärkten Reaktion der Zellen auf die Ang II-Stimulation führen. Dass dabei auch Ca^{2+}-unabhängige Signalwege verstärkt würden, könnte erklären, warum trotz Behandlung mit Mibefradil und KN93 der verstärkende Effekt von NaAc noch immer vorhanden ist. Natürlich ist es aber durchaus auch möglich, dass die Ca^{2+}-unabhängigen Wege selbst durch den veränderten pH beeinflusst werden.

Interessanterweise zeigen beide Inhibitoren keinerlei Einfluss auf die Ang II-stimulierte CYP11B2-Expression (vgl. Abbildung 20B) – sowohl mit als auch ohne NaAc. In bisherigen Studien mit Mibefradil und KN93 konnte zwar gezeigt werden, dass der Einfluss der Inhibitoren auf die CYP11B2-Expression bei Stimulation mit Ang II nur gering ist (Pezzi et al. 1997; Imagawa et al. 2006), dennoch überrascht es, dass die CYP11B2-Expression durch Hemmung des Ca^{2+}-Signalwegs überhaupt nicht beeinflusst wird. Eine geringere Effektivität von Mibefradil auf Ang II-stimulierte Zellen würde sich damit erklären lassen, dass die Ca^{2+}-Freisetzung aus den internen Speichern nicht von dem T-Typ Calciumkanal-Blocker beeinflusst wird. Das Vorhandensein unterschiedlicher CaMK könnte eine mögliche Erklärung sein, warum KN93 die CYP11B2-Expression nicht beeinflusst. KN93 wurde deshalb ausgewählt, da es relativ spezifisch die CaMKII hemmt. Diese ist an der Regulation der Aktivität von T-Typ Calciumkanälen beteiligt (Barrett et al. 2000). Für die Weiterleitung der Ca^{2+}-Signale und die Regulation der CYP11B2-Expression hingegen ist hauptsächlich CaMKI und in geringerem Maße auch CaMKIV verantwortlich (Condon et al. 2002). Möglicherweise wurde mit

KN93 also nur ein Effekt auf die Calciumkanäle der Plasmamembran – ähnlich wie mit Mibefradil – erzielt, jedoch nicht die Signalweiterleitung und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren gehemmt. In diesem Fall würde vermutlich ebenfalls die Ca^{2+}-Freisetzung aus den internen Speichern für die nicht veränderte CYP11B2-Expression verantwortlich sein.

Dass die Aldosteronproduktion durch die Inhibitoren gehemmt wird, obwohl die Expression von CYP11B2 nicht beeinträchtigt wird, liegt möglicherweise daran, dass Ca^{2+} auch die Expression und Funktion anderer an der Steroidhormonbiosynthese beteiligte Enzyme reguliert. So wurde bereits gezeigt, dass Ca^{2+} den Cholesteroltransport in die Mitochondrien durch das StAR-Protein beeinflusst (Cherradi et al. 1996; Cherradi et al. 1997) und dass Ca^{2+} weiterhin zu einer verstärkten Bildung von NADPH führt, welches wiederum ein wichtiger Co-Faktor der CYP-Enzyme ist (Wiederkehr et al. 2011). Der Rückgang der Aldosteronproduktion durch Mibefradil und KN93 könnte also vor allem darauf zurückzuführen sein, dass die Inhibitoren bereits frühere Schritte der Aldosteronproduktion hemmen.

4.2.2 pH-Einfluss auf den PKC- und PKD-Signalweg

Da Ang II neben dem Ca^{2+}-Signalweg weitere Wege aktiviert, wurde geprüft, ob und inwiefern diese durch NaAc reguliert werden. Dabei wurde zunächst untersucht, welchen Einfluss NaAc auf den Proteinkinase C- (PKC-) bzw. Proteinkinase D (PKD)-Signalweg hat. Im Laufe der Signalkaskade, die durch Ang II ausgelöst wird, entsteht DAG, welches unter anderem zu einer Aktivierung der PKC führt (Nakano et al. 1990; Bollag et al. 1991). Die PKC wiederum führt in den Glomerulosazellen zu einer erhöhten Aldosteronproduktion, indem es die Expression von CYP11B2 und STAR verstärkt. Zusätzlich führt sie auch zu einer stärkeren Phosphorylierung des StAR-Proteins (LeHoux et al. 2001; Betancourt-Calle et al. 2001; Manna et al. 2009). Ebenso aktiviert die PKC auch die PKD, wobei letztere auch direkt über DAG reguliert werden kann (Wang 2006; Olala et al. 2014b). Auch die PKD führt zu einer erhöhten Aldosteronproduktion, indem unter anderem die Expression von CYP11B2 und STAR verstärkt wird (Romero et al. 2006; Shapiro et al. 2010; Olala et al. 2014a; Olala et al. 2014b). Daher wurde der Einfluss von NaAc auf den PKC- und PKD-Signalweg mit den Inhibitoren Gö-6983 (PKC) und CRT0066101 (PKD) untersucht.

Dabei führte die Hemmung der PKC zu keinen Veränderungen der Aldosteronproduktion und der mRNA-Expression von CYP11B2 in Ang II-stimulierten NCI-Zellen (vgl. Abbildung 21). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass möglicherweise der tatsächliche Anteil der PKC an der Aldosteronsynthese eher gering ist bzw. dass die durch Gö-6983 gehemmte Funktion der PKC durch die anderen Mechanismen, die die Aldosteronproduktion regulieren (vor allem der Ca^{2+}-Signalweg), ausge-

glichen werden können. Eine weitere Ursache könnten die verschiedenen Isoformen der PKC sein. Aktuell sind zehn Isoformen der PKC sowie eine Reihe weiterer verwandter Kinasen (zu denen auch die PKD zählt) bekannt (Mellor und Parker 1998; Newton 2018). In der Nebenniere wurden die Isoformen PKC-α, -ε und -ζ nachgewiesen, in NCI-Zellen zusätzlich noch die PKC-θ (LeHoux et al. 2000). Dabei hemmt der Inhibitor Gö-6983 nur einen Teil dieser Isoformen (Gschwendt et al. 1996). Zusätzlich zeigen Studien, dass unterschiedliche PKC-Isoformen die CYP11B2-Expression unterschiedlich regulieren. So soll die PKC-α eher zu einer Hemmung des CYP11B2-Promotors führen, während die PKC-ζ diesen eher stimuliert (LeHoux et al. 2001). Dass Gö-6983 keinen Einfluss auf die Aldosteronproduktion und die CYP11B2-Expression hat, könnte also auch daran liegen, dass möglicherweise vorwiegend die CYP11B2-hemmende PKC-α inhibiert wird. Auch der Einfluss anderer PKC-Isoformen, die nicht von Gö-6983 gehemmt werden, könnte eine mögliche Rolle spielen. Weiterhin ist es auch möglich, dass die Behandlung mit Gö-6983 keinen Einfluss auf Aldosteronsynthese und CYP11B2-Expression hatte, weil möglicherweise die verwendete Konzentration (10 µM) zu gering war, um eine ausreichende Hemmung der PKC zu gewährleisten.

Im Gegensatz zur Hemmung der PKC führte die Inhibition der PKD mit CRT0066101 zu einer deutlich reduzierten Aldosteronproduktion in den Ang II-stimulierten Zellen. Zusätzlich hatte unter PKD-Hemmung NaAc keinen verstärkenden Einfluss mehr (vgl. Abbildung 21A). Auf die mRNA-Expression von CYP11B2 hingegen wirkte CRT0066101 eher stimulierend. Auch war hier ein deutlicher NaAc-Effekt vorhanden (vgl. Abbildung 21B). Dies zeigt einerseits, dass der PKD-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Aldosteronsynthese spielt und dass Veränderungen des pH-Wertes den PKD-Signalweg beeinflussen. Andererseits deutet die Erhöhung der CYP11B2-Expression darauf hin, dass die PKD vermutlich eher andere an der Steroidhormonbiosynthese beteiligte Enzyme reguliert.

Daher wurde als nächster Schritt die mRNA-Expression einiger dieser Enzyme untersucht (vgl. Abbildung 22). Die Expression von NR4A2 und HSD3B2 wurde durch Gö-6983 eher reduziert, während CRT0066101 die Expression der beiden Gene verstärkte. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Inhibitoren zu einer Hemmung der Aktivität von PKC und PKD führen, welche nicht zwangsläufig mit der Expression der Zielproteine der beiden Kinasen zusammenhängt. Daneben können mRNA- und Proteinexpression auch unterschiedlich reguliert sein. Eine weitere Erklärung wäre, dass die unter PKD-Hemmung reduzierte Aldosteronproduktion durch die gesteigerte Expression wichtiger Gene kompensiert werden soll. Die STAR-Expression wurde durch beide Inhibitoren gesenkt. Dies passt zu den bisher veröffentlichten Studien, die zeigen, dass sowohl die PKC als auch die PKD die STAR-Expression erhöhen (Manna et al. 2009; Olala et al. 2014a). Allerdings führte NaAc unabhängig von den Inhibitoren zu einer verstärkten Expression von STAR. Dies zeigt,

dass die STAR-Expression selbst von Veränderungen des pH abhängt, dieser Effekt des pH-Wertes aber nicht durch PKC oder PKD vermittelt wird. Weiterhin ist unklar, ob STAR durch den pH direkt oder indirekt reguliert wird. In letzterem Fall könnte der veränderte pH andere Faktoren beeinflussen, die zu einer erhöhten Aldosteronsynthese führen. In diesem Fall wäre auch ein vermehrter Cholesteroltransport in die Mitochondrien und damit eine erhöhte STAR-Aktivität (und möglicherweise auch Expression) nötig. Auch die CYP21A2-Expression wurde durch beide Inhibitoren gesenkt. Dabei hatte Gö-6983 erneut einen stärkeren Effekt als CRT0066101. Bereits frühere Studien hatten belegt, dass die Expression von CYP21A2 durch die PKC verstärkt wird (Bird et al. 1998a, 1998b). Bei beiden Inhibitoren zeigte NaAc keinen verstärkenden Effekt. Dies würde auch zu den Ergebnissen der Aldosteronmessungen passen, bei denen CRT0066101 ebenfalls zu einer Reduktion und dem Wegfall des NaAc-Effektes führte. Es ist also möglich, dass die PKD die CYP21A2-Expression reguliert und dass pH-Veränderungen diese Regulation beeinflussen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Ang II-stimulierten Zellen insbesondere der PKD-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Aldosteronsynthese spielt und dass die PKD ihren Einfluss vornehmlich über die Expression von STAR und teilweise auch CYP21A2 vermittelt. Weiterhin könnte ein Einfluss des intrazellulären pH-Wertes auf die CYP21A2-Expression ebenfalls PKD-abhängig sein.

4.2.3 Weitere pH-abhängige Signalwege in Ang II-stimulierten NCI-Zellen

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, dass der pH-Wert teilweise den Ca^{2+}-Signalweg beeinflusst, dass jedoch vor allem bei Stimulation mit Ang II auch noch andere Signalwege durch NaAc reguliert werden. Die Untersuchung des PKC- und PKD-Weges hat gezeigt, dass insbesondere die PKD eine Rolle bei der Aldosteronproduktion spielt und dass die Hemmung der PKD dabei auch zum Verlust des verstärkenden NaAc-Effekts führt. Eine Rolle in diesem Prozess spielen möglicherweise STAR und CYP21A2. Dennoch ist der genaue Mechanismus, wie Veränderungen des pH die Aldosteronsynthese beeinflussen, noch immer nicht abschließend geklärt. Um weitere mögliche Kandidaten zu identifizieren, die in diesem Zusammenhang ebenfalls eine Rolle spielen, wurde daher eine Proteomanalyse durchgeführt. Dabei wurde untersucht, welche Proteine in ihrer Expression bei Stimulation mit Kalium oder Ang II und gleichzeitiger Behandlung mit NaAc reguliert werden. Da jedoch, wie bereits erwähnt, der pH-Effekt in K^+-stimulierten Zellen vornehmlich über Ca^{2+}-abhängige Mechanismen vermittelt wird, wurde bei der Auswertung der Ergebnisse der Proteomanalyse nach Kandidaten gesucht, deren Expression bei gleichzeitiger Stimulation mit Ang II und NaAc verändert war. Dabei zeigte sich, dass nur wenige Proteine reguliert waren, wenn das übliche

Signifikanzniveau und eine ausreichend starke Regulation vorausgesetzt wurden. Eine unzureichende Stimulation kann als Ursache dafür jedoch ausgeschlossen werden, da von allen Ansätzen im Vorfeld die Aldosteronproduktion gemessen wurde (vgl. Abbildung 23) und die Ansätze nur zur Analyse gegeben wurden, wenn die Stimulation erfolgreich war. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass bei der Proteomanalyse durch zu große Schwankungen zwischen den einzelnen Ansätzen keine Signifikanz besteht, aber dass die Aldosteronsynthese trotzdem in allen Ansätzen in ähnlichem Maße beeinflusst wird. Ein weiterer Faktor, der eine Rolle spielen könnte, ist, dass bei der Analyse nur die Proteinexpression ermittelt wird. Für die Funktion eines Proteins sind allerdings auch andere Faktoren, wie posttranslationale Modifikationen, entscheidend. Sollte die Stimulation also zu einer verstärkten Aktivierung, beispielsweise durch Phosphorylierung, führen, wird dies bei der Proteomanalyse nicht erfasst. Um dennoch aufgrund der begrenzten Zeit am Ende der Doktorarbeit einen Nutzen aus den Proteomdaten ziehen zu können, wurden daher weniger strenge Kriterien für die Auswahl von Kandidaten angewendet. Dies geschah jedoch nur unter der Bedingung, dass sich die in der Proteomanalyse gefundene Regulation durch Western Blot auch in unabhängigen Proben verifizieren ließ.

4.2.3.1 Bekannte Enzyme der Steroidhormonbiosynthese

Zu den so gefundenen Proteinen gehörten die an der Steroidhormonbiosynthese beteiligten Enzyme Aldosteronsynthase (CYP11B2), StAR und 21-Hydroxylase (CYP21A2). Die durch Stimulation verursachte Erhöhung der Proteinexpression dieser Proteine war allerdings insgesamt geringer als die entsprechende Erhöhung der mRNA-Expression. Besonders deutlich war dies bei CYP11B2. Dessen mRNA-Expression war unter Ang II und NaAc ca. fünfzigfach erhöht, die Proteinexpression jedoch nur etwas mehr als doppelt so hoch (jeweils bezogen auf die unstimulierten Kontrollzellen). Dies zeigt ebenfalls, dass die Ergebnisse von mRNA- und Proteinexpression differenziert betrachtet werden müssen. Dennoch zeigten auch die Ergebnisse der Western Blots, die zur Verifizierung der Proteomdaten durchgeführt wurden, dass die Expression aller drei Proteine durch Ang II und NaAc noch einmal stärker war als mit Ang II allein (vgl. Abbildung 25). Dass die Quantifizierung der CYP11B2-Proteinexpression dabei keine signifikanten Unterschiede liefert, liegt vermutlich daran, dass das Protein in den NCI-Zellen recht schwach exprimiert wird, wodurch die Quantifizierung der Western Blots größeren Schwankungen unterworfen war. Auch bei der Quantifizierung der CYP21A2-Expression sind die Unterschiede nicht signifikant. Hier wurden allerdings bisher nur vier Wiederholungen durchgeführt. Durch diese geringe Anzahl fallen Schwankungen stärker ins Gewicht. Außerdem wurde die Detektion von CYP21A2 meist erst durchgeführt, nachdem bereits andere Proteine untersucht worden waren. Dadurch waren die Membranen teilweise bereits

mehrfach gestrippt. Dies könnte dazu geführt haben, dass neben den Antikörpern auch teilweise die geblotteten Proteine abgelöst wurden. Dies wiederum könnte die Immundetektion von CYP21A2 beeinflusst haben. Daher sind weitere Wiederholungen der Versuche nötig, bei denen die Membranen ohne vorheriges Strippen mit dem CYP21A2-Antikörper behandelt werden. Dennoch scheinen die bisherigen Experimente aus den Western-Blot-Analysen die Ergebnisse der Proteomanalyse zu bestätigen. Vermutlich liegt die Regulation dieser drei Proteine auch der erhöhten Aldosteronproduktion zugrunde. Allerdings ist dabei weiterhin nicht klar, auf welche Weise NaAc die Expression dieser Proteine beeinflusst.

4.2.3.2 Weitere Kandidaten mit potentiellem Einfluss auf die Aldosteronsynthese

Neben diesen bereits bekannten Enzymen wurden durch Literaturrecherche weitere Proteine identifiziert, die möglicherweise die Aldosteronsynthese beeinflussen könnten. Ein möglicher Kandidat dabei war das *CTTNBP2 N-terminal-like protein* (CTTNBP2NL), dessen Expression durch NaAc verstärkt wurde. Über die Funktion von CTTNBP2NL ist bisher wenig bekannt. Allerdings wurde gezeigt, dass es mit der Protein Phosphatase 2A (PP2A) interagiert und auch dessen Aktivität verstärkt (Goudreault et al. 2009; Sugimoto et al. 2013). Die PP2A wiederum reguliert über cAMP die STAR-Expression (Burns et al. 2000; Jones et al. 2000). Möglicherweise führt NaAc also über die verstärkte Expression von CTTNBP2NL zu einer erhöhten STAR-Expression. Dazu passt auch, dass die Proteinexpression von *Cancerous inhibitor of PP2A* (CIP2A) durch NaAc verringert wird. CIP2A hemmt die Aktivität der PP2A (Junttila et al. 2007). Eine geringere Expression von CIP2A unter NaAc würde also zu einer geringeren Hemmung der PP2A führen, was wiederum die STAR-Expression verstärken könnte. Der Signalweg über PP2A könnte also möglicherweise ein neuer Ansatzpunkt sein, wenn es um den Einfluss des pH-Wertes auf die Aldosteronsynthese geht. Allerdings müssen dazu die Ergebnisse der Proteomanalyse noch mittels Western Blot bestätigt werden. Bei den in Abbildung 26 gezeigten Western Blots handelt es sich um das Ergebnis erster Vorversuche. Auch muss dabei erwähnt werden, dass für CTTNBP2NL kein geeigneter Antikörper verfügbar war, weshalb als Alternative die katalytische Untereinheit der PP2A (PPP2CA), mit der CTTNBP2NL interagiert, detektiert wurde. Dabei erlaubt die PPP2CA-Expression natürlich keinen direkten Rückschluss auf die CTTNBP2NL-Expression. Dennoch könnte die Detektion der PPP2A-Expression erste Anhaltspunkte liefern, ob die PP2A tatsächlich ein neuer Ansatz für den pH-Einfluss auf die Aldosteronproduktion ist.

Ein weiterer Kandidat ist die Glycerolkinase (GK). Patienten, die unter Glycerolkinase-Mangel leiden, zeigen häufig auch einen adrenalen Phänotyp. Zunächst ging man dabei davon aus, dass der

Mangel an GK die Phospholipid-Synthese reguliert und dies wiederum die Steroidhormonbiosynthese beeinflusst (Seltzer et al. 1985). Neuere Studien zeigen allerdings, dass der Zusammenhang zwischen Glycerolkinase-Mangel und Nebennierenhypoplasie dadurch kommt, dass GK auf demselben X-chromosomalen Lokus liegt wie NR0B1 (auch DAX1 genannt), welches an der Entstehung von kongenitaler Nebennierenhypoplasie beteiligt ist. Bei einer Deletionen dieses Lokus sind daher häufig beide Gene betroffen (Peter et al. 1998; McCabe 2007). Dennoch stellt das durch die GK gebildete Gylcerol-3-phosphat einen wichtigen Ausgangsstoff der Triglyceride, aber auch der Phospholipide dar (Wendel et al. 2009). Eine verstärkte GK-Expression beeinflusst also den Fettstoffwechsel und möglicherweise tatsächlich auch die Phospholipid-Synthese. Ob dies auch tatsächlich Auswirkungen auf die Aldosteronsynthese hat, muss allerdings durch zusätzliche Experimente untersucht werden.

Ein weiterer Kandidat, dessen Expression durch NaAc verstärkt wurde, war Apolipoprotein O (APOO). Dieses Protein ist Bestandteil des sogenannten MICOS-Komplexes *(mitochondrial contact site and cristae organizing system*) (Koob et al. 2015). Dieser Multiproteinkomplex sitzt in der inneren Mitochondrienmembran und ist wichtig für die Ausbildung der *Cristae*-Strukturen der Mitochondrien. Darüber hinaus wird vermutet, dass der MICOS-Komplex generell eine wichtige Rolle für die mitochondrielle Funktion spielt (Kozjak-Pavlovic 2017). So wurde erst kürzlich eine APOO-Mutation beschrieben, die bei den betroffenen Patienten unter anderem zu Entwicklungsstörungen, kognitiven Beeinträchtigungen und autistischem Verhalten führte. Funktionelle Untersuchungen der Mutation zeigten, dass es dadurch zu Beeinträchtigungen der mitochondriellen Struktur und Funktion kommt (Benincá et al. 2021). Neben seiner Rolle in Mitochondrien wurde APOO aber auch als Bestandteil der verschiedenen Lipoproteine HDL, LDL und VLDL nachgewiesen (Lamant et al. 2006). Dabei scheint in den Lipoproteinen insbesondere die glykosylierte APOO-Form (55 kDa) vorhanden zu sein, während der MICOS-Komplex ausschließlich von der unglykosylierten Form (22 kDa) gebildet wird (Koob et al. 2015). Da bei der Proteomanalyse jedoch keine posttranslationalen Modifikationen untersucht wurden, ist nicht bekannt, ob NaAc eher zu einer Zunahme der glykosylierten oder der unglykosylierten Form führte. Im vorläufig durchgeführten Western Blot (vgl. Abbildung 26) wurde jedoch keine Bande bei 22 kDa gefunden. Stattdessen konnte nur eine Bande im Bereich von 50 - 75 kDa detektiert werden. Es wird davon ausgegangen, dass es sich dabei um die Bande der glykosylierten Form handelt, was belegen würde, dass in den adrenalen NCI-Zellen vor allem diese Form dominiert. Dennoch sind weitere Versuche nötig, um die mögliche Rolle von APOO bei der Aldosteronsynthese zu klären.

Ein weiterer Kandidat ist der Kaliumkanal KCNJ5, dessen Expression durch NaAc verringert wurde. In diesem Kanal wurden als erstes und bisher auch am häufigsten APA-assoziierte Mutationen

nachgewiesen (Choi et al. 2011). Obwohl die Expression von KCNJ5 in der *Zona glomerulosa* und auch der *Zona fasciculata* nachgewiesen wurde (Azizan et al. 2012), ist die genaue physiologische Rolle des Kanals noch nicht abschließend geklärt. Eine Überexpression von KCNJ5 führte in bisherigen Studien zu einer Hyperpolarisation der Zellen, einer gesenkten Ca^{2+}-Aktivität und zu einer geringeren Expression von Enzymen der Steroidhormonbiosynthese, u.a. CYP11B2 (Oki et al. 2012). Daneben bewirkte die Hemmung von KCNJ5 eine verstärkte CYP11B2-Expression (Cheng et al. 2015). Vermutlich stabilisiert der Kanal das Ruhemembranpotential, beeinflusst die Depolarisation der Nebennierenzellen und wirkt so eher hemmend auf die Aldosteronproduktion. Eine geringere KCNJ5-Expression, wie sie bei der Proteomanalyse unter Ang II und NaAc detektiert wurde, würde also zu einer verstärkten Aldosteronsynthese beitragen. Daneben wurde auch beschrieben, dass die Funktion von KCNJ5 durch intrazelluläre Ansäuerung gehemmt wird (Mao et al. 2003). Dies würde zusätzlich zur geringeren Expression die Depolarisation der Zellen unter Stimulation verstärken. Ob NaAc aber tatsächlich auf diese Weise auf KCNJ5 wirkt oder zusätzliche Mechanismen beteiligt sind, müsste in jedem Fall näher untersucht werden.

Für alle oben beschriebenen Kandidaten (CTTNBP2NL, CIP2A, GK, APOO und KCNJ5) wurde auch die mRNA-Expression unter K^+- und Ang II-Stimulation und Behandlung mit NaAc untersucht (vgl. Abbildung 24). Dabei zeigten sich jedoch kaum signifikante Unterschiede. Dies könnte an den insgesamt geringen Effekten liegen, da ja auch in der Proteomanalyse die Expressionen nur gering unterschiedlich waren. Außerdem müssen mRNA- und Protein-Expression differenziert betrachtet werden, da dabei noch eine Reihe weiterer Faktoren, beispielsweise die jeweiligen Halbwertszeiten der mRNAs und der Proteine, eine Rolle spielen. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung, warum die Genexpression von KCNJ5 unter Ang II und NaAc signifikant erhöht ist, die Proteinexpression bei der Proteomanalyse jedoch erniedrigt war. Außerdem müssen bei der Analyse der möglichen Kandidaten weitere Faktoren, wie posttranslationale Modifikationen, beachtet werden.

Wie bereits mehrfach erwähnt, handelt es sich bei den in Abbildung 26 gezeigten Western Blot nur um Vorversuche, um einen ersten Eindruck der Proteinexpression der ausgewählten Kandidaten zu bekommen. Daraus lässt sich noch nicht folgern, ob die Ergebnisse zu den Daten der Proteomanalyse passen und sich letztere damit bestätigen lassen. Daher sollen sie hier auch im Einzelnen nicht näher diskutiert werden. Erst wenn die Versuche mit ausreichend Ansätzen wiederholt worden sind, lässt sich eine sinnvolle Aussage dazu treffen, wie die einzelnen Stimuli die Proteinexpression beeinflussen und ob damit die Daten der Proteomanalyse verifiziert werden können. Sollte dies der Fall sein, muss in weiteren Experimenten geklärt werden, ob die einzelnen Kandidaten tatsächlich ursächlich für die erhöhte Aldosteronproduktion sind und falls ja, welche genauen Mechanismen dabei zugrunde liegen.

4.3 Fazit

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie die Mutation CACNA1H^{M1549V} zur Pathophysiologie des Primären Hyperaldosteronismus beiträgt. Dabei wurde gefunden, dass in der Gegenwart von physiologischen Ionenkonzentrationen der mutierte Kanal in adrenalen NCI-H295R-Zellen bei stärker hyperpolarisiertem Membranpotential öffnet und dadurch bereits im Bereich des Ruhemembranpotentials von nativen Glomerulosazellen aktiv ist. Zusätzlich führt die Mutation zur Entstehung von Oszillationen des Membranpotentials. Beide Faktoren führen zu einer Störung der zellulären Ca^{2+}-Homöostase. Die partielle Na^{+}-Leitfähigkeit des Kanals trägt ebenfalls zu diesen Effekten bei. Die Daten zeigen, wie wichtig der zelluläre Hintergrund für die funktionelle Charakterisierung adrenaler Membranproteine ist. Gleichzeitig wird klar, wie CACNA1H^{M1549V} zu einer von Stimulation unabhängigen Aldosteronproduktion führen kann. Weiterhin zeigen die Ergebnisse die Bedeutung von CACNA1H bei der Kontrolle der Aldosteronsynthese. Außerdem wurde zum ersten Mal ein adrenales Zellmodell gefunden, in dem Oszillationen des Membranpotentials induzierbar waren. Dies konnte bisher nur an Nebennierenschnitten, aber nicht bei Primärzellen oder adrenalen Zelllinien beobachtet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, wie der intrazelluläre pH die Aldosteronproduktion beeinflusst. Die Hemmung des Ca^{2+}-Signalwegs durch Mibefradil und KN93 zeigte, dass der verstärkende Effekt von NaAc zumindest teilweise Ca^{2+}-vermittelt ist, in Ang II-stimulierten Zellen aber noch weitere pH-abhängige Wege aktiviert sein müssen. Durch Hemmung der PKC und der PKD wurde deutlich, dass insbesondere die PKD für die Aldosteronsynthese wichtig ist und der pH dabei ebenfalls Einfluss nimmt. Allerdings scheint dabei CYP11B2 eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Vielmehr beeinflusst die PKD die Aldosteronproduktion eher über StAR und CYP21A2. Zusätzlich wurde mittels Proteomanalyse nach Proteinen gesucht, die bisher im Zusammenhang mit Aldosteron unbekannt waren, aber deren Expression durch NaAc beeinflusst wird. Die Expression der dabei ausgewählten Kandidaten muss nun zunächst in unabhängigen Experimenten bestätigt werden. Anschließend sind weitere Versuche nötig, um zu entschlüsseln, ob und über welche Mechanismen diese Kandidaten möglicherweise an der Aldosteronsynthese beteiligt sind.

5 Literaturverzeichnis

Aguilera, G. (1987): Differential effects of atrial natriuretic factor on angiotensin II- and adrenocorticotropin-stimulated aldosterone secretion. In: *Endocrinology* 120 (1), S. 299–304. DOI: 10.1210/endo-120-1-299.

Åkerström, Tobias; Crona, Joakim; Delgado Verdugo, Alberto; Starker, Lee F.; Cupisti, Kenko; Willenberg, Holger S. et al. (2012): Comprehensive re-sequencing of adrenal aldosterone producing lesions reveal three somatic mutations near the KCNJ5 potassium channel selectivity filter. In: *PloS one* 7 (7), e41926. DOI: 10.1371/journal.pone.0041926.

Åkerström, Tobias; Maharjan, Rajani; Sven Willenberg, Holger; Cupisti, Kenko; Ip, Julian; Moser, Ana et al. (2016): Activating mutations in CTNNB1 in aldosterone producing adenomas. In: *Scientific reports* 6, S. 19546. DOI: 10.1038/srep19546.

Alnemri, E. S.; Maksymowych, A. B.; Robertson, N. M.; Litwack, G. (1991): Overexpression and characterization of the human mineralocorticoid receptor. In: *Journal of Biological Chemistry* 266 (27), S. 18072–18081. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)55238-8.

Arakane, F.; Kallen, C. B.; Watari, H.; Foster, J. A.; Sepuri, N. B.; Pain, D. et al. (1998): The mechanism of action of steroidogenic acute regulatory protein (StAR). StAR acts on the outside of mitochondria to stimulate steroidogenesis. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (26), S. 16339–16345. DOI: 10.1074/jbc.273.26.16339.

Arakane, F.; King, S. R.; Du, Y.; Kallen, C. B.; Walsh, L. P.; Watari, H. et al. (1997): Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (51), S. 32656–32662. DOI: 10.1074/jbc.272.51.32656.

Aronson, P. S. (1985): Kinetic properties of the plasma membrane Na+-H+ exchanger. In: *Annual review of physiology* 47, S. 545–560. DOI: 10.1146/annurev.ph.47.030185.002553.

Arriza, J. L.; Weinberger, C.; Cerelli, G.; Glaser, T. M.; Handelin, B. L.; Housman, D. E.; Evans, R. M. (1987): Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. In: *Science (New York, N.Y.)* 237 (4812), S. 268–275. DOI: 10.1126/science.3037703.

Atarashi, K.; Mulrow, P. J.; Franco-Saenz, R.; Snajdar, R.; Rapp, J. (1984): Inhibition of aldosterone production by an atrial extract. In: *Science (New York, N.Y.)* 224 (4652), S. 992–994. DOI: 10.1126/science.6326267.

Atlas, Steven A. (2007): The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. In: *Journal of managed care pharmacy : JMCP* 13 (8 Suppl B), S. 9–20. DOI: 10.18553/jmcp.2007.13.s8-b.9.

Aunis, D.; Langley, K. (1999): Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. In: *Acta physiologica Scandinavica* 167 (2), S. 89–97. DOI: 10.1046/j.1365-201x.1999.00580.x.

Azizan, Elena A. B.; Lam, Brian Y. H.; Newhouse, Stephen J.; Zhou, Junhua; Kuc, Rhoda E.; Clarke, Jennifer et al. (2012): Microarray, qPCR, and KCNJ5 sequencing of aldosterone-producing adenomas reveal differences in genotype and phenotype between zona glomerulosa- and zona fasciculata-like tumors. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97 (5), E819-29. DOI: 10.1210/jc.2011-2965.

Azizan, Elena A. B.; Poulsen, Hanne; Tuluc, Petronel; Zhou, Junhua; Clausen, Michael V.; Lieb, Andreas et al. (2013): Somatic mutations in ATP1A1 and CACNA1D underlie a common subtype of adrenal hypertension. In: *Nature genetics* 45 (9), S. 1055–1060. DOI: 10.1038/ng.2716.

Bandulik, S. (2017): Of channels and pumps: different ways to boost the aldosterone? In: *Acta physiologica (Oxford, England)* 220 (3), S. 332–360. DOI: 10.1111/apha.12832.

Barrett, P. Q.; Bollag, W. B.; Isales, C. M.; McCarthy, R. T.; Rasmussen, H. (1989): Role of calcium in angiotensin II-mediated aldosterone secretion. In: *Endocrine reviews* 10 (4), S. 496–518. DOI: 10.1210/edrv-10-4-496.

Barrett, P. Q.; Isales, C. M.; Bollag, W. B.; McCarthy, R. T. (1991): Ca2+ channels and aldosterone secretion: modulation by K+ and atrial natriuretic peptide. In: *The American journal of physiology* 261 (4 Pt 2), F706-19. DOI: 10.1152/ajprenal.1991.261.4.F706.

Barrett, P. Q.; Lu, H. K.; Colbran, R.; Czernik, A.; Pancrazio, J. J. (2000): Stimulation of unitary T-type Ca(2+) channel currents by calmodulin-dependent protein kinase II. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 279 (6), C1694-703. DOI: 10.1152/ajpcell.2000.279.6.C1694.

Barrett, Paula Q.; Guagliardo, Nick A.; Klein, Peter M.; Hu, Changlong; Breault, David T.; Beenhakker, Mark P. (2016): Role of voltage-gated calcium channels in the regulation of aldosterone production from zona glomerulosa cells of the adrenal cortex. In: *The Journal of physiology* 594 (20), S. 5851–5860. DOI: 10.1113/JP271896.

Bassett, Mary H.; Suzuki, Takashi; Sasano, Hironobu; White, Perrin C.; Rainey, William E. (2004a): The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 18 (2), S. 279–290. DOI: 10.1210/me.2003-0005.

Bassett, Mary H.; White, Perrin C.; Rainey, William E. (2004b): The regulation of aldosterone synthase expression. In: *Molecular and cellular endocrinology* 217 (1-2), S. 67–74. DOI: 10.1016/j.mce.2003.10.011.

Benincá, Cristiane; Zanette, Vanessa; Brischigliaro, Michele; Johnson, Mark; Reyes, Aurelio; Valle, Daniel Almeida do et al. (2021): Mutation in the MICOS subunit gene APOO (MIC26) associated with an X-linked recessive mitochondrial myopathy, lactic acidosis, cognitive impairment and autistic features. In: *Journal of medical genetics* 58 (3), S. 155–167. DOI: 10.1136/jmedgenet-2020-106861.

Berthon, Annabel; Drelon, Coralie; Ragazzon, Bruno; Boulkroun, Sheerazed; Tissier, Frédérique; Amar, Laurence et al. (2014): WNT/β-catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. In: *Human molecular genetics* 23 (4), S. 889–905. DOI: 10.1093/hmg/ddt484.

Betancourt-Calle, Soraya; Calle, Roberto A.; Isales, Carlos M.; White, Stephanie; Rasmussen, Howard; Bollag, Wendy B. (2001): Differential effects of agonists of aldosterone secretion on steroidogenic acute regulatory phosphorylation. In: *Molecular and cellular endocrinology* 173 (1-2), S. 87–94. DOI: 10.1016/S0303-7207(00)00411-1.

Beuschlein, Felix; Boulkroun, Sheerazed; Osswald, Andrea; Wieland, Thomas; Nielsen, Hang N.; Lichtenauer, Urs D. et al. (2013): Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. In: *Nature genetics* 45 (4), 440-4, 444e1-2. DOI: 10.1038/ng.2550.

Bhargava, A.; Fullerton, M. J.; Myles, K.; Purdy, T. M.; Funder, J. W.; Pearce, D.; Cole, T. J. (2001): The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. In: *Endocrinology* 142 (4), S. 1587–1594. DOI: 10.1210/endo.142.4.8095.

Bird, I. M.; Hanley, N. A.; Word, R. A.; Mathis, J. M.; McCarthy, J. L.; Mason, J. I.; Rainey, W. E. (1993): Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion. In: *Endocrinology* 133 (4), S. 1555–1561. DOI: 10.1210/endo.133.4.8404594.

Bird, I. M.; Mason, J. I.; Rainey, W. E. (1998a): Battle of the kinases: integration of adrenal responses to cAMP, DG and Ca2+ at the level of steroidogenic cytochromes P450 and 3betaHSD expression in H295R cells. In: *Endocrine research* 24 (3-4), S. 345–354. DOI: 10.3109/07435809809032614.

Bird, I. M.; Mason, J. I.; Rainey, W. E. (1998b): Protein kinase A, protein kinase C, and Ca(2+)-regulated expression of 21-hydroxylase cytochrome P450 in H295R human adrenocortical cells. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83 (5), S. 1592–1597. DOI: 10.1210/jcem.83.5.4825.

Blaustein, M. P.; Lederer, W. J. (1999): Sodium/calcium exchange: its physiological implications. In: *Physiological reviews* 79 (3), S. 763–854. DOI: 10.1152/physrev.1999.79.3.763.

Bollag, W. B.; Barrett, P. Q.; Isales, C. M.; Liscovitch, M.; Rasmussen, H. (1990): A potential role for phospholipase-D in the angiotensin-II-induced stimulation of aldosterone secretion from bovine adrenal glomerulosa cells. In: *Endocrinology* 127 (3), S. 1436–1443. DOI: 10.1210/endo-127-3-1436.

Bollag, W. B.; Barrett, P. Q.; Isales, C. M.; Rasmussen, H. (1991): Angiotensin-II-induced changes in diacylglycerol levels and their potential role in modulating the steroidogenic response. In: *Endocrinology* 128 (1), S. 231–241. DOI: 10.1210/endo-128-1-231.

Boulkroun, Sheerazed; Samson-Couterie, Benoit; Dzib, José-Felipe Golib; Lefebvre, Hervé; Louiset, Estelle; Amar, Laurence et al. (2010): Adrenal cortex remodeling and functional zona glomerulosa hyperplasia in primary aldosteronism. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 56 (5), S. 885–892. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.158543.

Brilla, C. G.; Pick, R.; Tan, L. B.; Janicki, J. S.; Weber, K. T. (1990): Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. In: *Circulation research* 67 (6), S. 1355–1364. DOI: 10.1161/01.res.67.6.1355.

Brini, Marisa; Carafoli, Ernesto (2011): The plasma membrane Ca^{2}+ ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (2). DOI: 10.1101/cshperspect.a004168.

Burns, C. J.; Gyles, S. L.; Persaud, S. J.; Sugden, D.; Whitehouse, B. J.; Jones, P. M. (2000): Phosphoprotein phosphatases regulate steroidogenesis by influencing StAR gene transcription. In: *Biochemical and biophysical research communications* 273 (1), S. 35–39. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2890.

Capponi, Alessandro M. (2002): Regulation of cholesterol supply for mineralocorticoid biosynthesis. In: *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13 (3), S. 118–121. DOI: 10.1016/S1043-2760(01)00538-0.

Caprio, Massimiliano; Newfell, Brenna G.; La Sala, Andrea; Baur, Wendy; Fabbri, Andrea; Rosano, Giuseppe et al. (2008): Functional mineralocorticoid receptors in human vascular endothelial cells regulate intercellular adhesion molecule-1 expression and promote leukocyte adhesion. In: *Circulation research* 102 (11), S. 1359–1367. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.174235.

Carbone, E.; Lux, H. D. (1984): A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. In: *Nature* 310 (5977), S. 501–502. DOI: 10.1038/310501a0.

Casey, Joseph R.; Grinstein, Sergio; Orlowski, John (2010): Sensors and regulators of intracellular pH. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 11 (1), S. 50–61. DOI: 10.1038/nrm2820.

Charmandari, Evangelia; Sertedaki, Amalia; Kino, Tomoshige; Merakou, Christina; Hoffman, Dax A.; Hatch, Michael M. et al. (2012): A novel point mutation in the KCNJ5 gene causing primary hyperaldosteronism and early-onset autosomal dominant hypertension. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97 (8), E1532-9. DOI: 10.1210/jc.2012-1334.

Chen, S. Y.; Bhargava, A.; Mastroberardino, L.; Meijer, O. C.; Wang, J.; Buse, P. et al. (1999): Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (5), S. 2514–2519. DOI: 10.1073/pnas.96.5.2514.

Cheng, Chih-Jen; Sung, Chih-Chien; Wu, Sheng-Tang; Lin, Yu-Chun; Sytwu, Huey-Kang; Huang, Chou-Long; Lin, Shih-Hua (2015): Novel KCNJ5 mutations in sporadic aldosterone-producing adenoma reduce Kir3.4 membrane abundance. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 100 (1), E155-63. DOI: 10.1210/jc.2014-3009.

Cherradi, N.; Brandenburger, Y.; Capponi, A. M. (1998): Mitochondrial regulation of mineralocorticoid biosynthesis by calcium and the StAR protein. In: *European journal of endocrinology* 139 (3), S. 249–256. DOI: 10.1530/eje.0.1390249.

Cherradi, N.; Rossier, M. F.; Vallotton, M. B.; Capponi, A. M. (1996): Calcium stimulates intramitochondrial cholesterol transfer in bovine adrenal glomerulosa cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (42), S. 25971–25975. DOI: 10.1074/jbc.271.42.25971.

Cherradi, N.; Rossier, M. F.; Vallotton, M. B.; Timberg, R.; Friedberg, I.; Orly, J. et al. (1997): Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome p450scc and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (12), S. 7899–7907. DOI: 10.1074/jbc.272.12.7899.

Choi, Murim; Scholl, Ute I.; Yue, Peng; Björklund, Peyman; Zhao, Bixiao; Nelson-Williams, Carol et al. (2011): K+ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. In: *Science (New York, N.Y.)* 331 (6018), S. 768–772. DOI: 10.1126/science.1198785.

Chow, Clara K.; Teo, Koon K.; Rangarajan, Sumathy; Islam, Shofiqul; Gupta, Rajeev; Avezum, Alvaro et al. (2013): Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. In: *JAMA* 310 (9), S. 959–968. DOI: 10.1001/jama.2013.184182.

Cirillo, M.; Canessa, M.; Quinn, S.; Conlin, P. R. (1998): Protein kinase C activation stimulates calcium transport in adrenal zona glomerulosa cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 245 (2), S. 466–471. DOI: 10.1006/bbrc.1998.8458.

Cohen, C. J.; McCarthy, R. T.; Barrett, P. Q.; Rasmussen, H. (1988): Ca channels in adrenal glomerulosa cells: K+ and angiotensin II increase T-type Ca channel current. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (7), S. 2412–2416. DOI: 10.1073/pnas.85.7.2412.

Condon, Jennifer C.; Pezzi, Vincenzo; Drummond, Brad M.; Yin, Su; Rainey, William E. (2002): Calmodulin-dependent kinase I regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase. In: *Endocrinology* 143 (9), S. 3651–3657. DOI: 10.1210/en.2001-211359.

Conlin, P. R.; Cirillo, M.; Zerbini, G.; Williams, G. H.; Canessa, M. L. (1993): Calcium-mediated intracellular acidification and activation of Na(+)-H+ exchange in adrenal glomerulosa cells stimulated with potassium. In: *Endocrinology* 132 (3), S. 1345–1352. DOI: 10.1210/endo.132.3.8382599.

Conlin, P. R.; Kim, S. Y.; Williams, G. H.; Canessa, M. L. (1990): Na(+)-H+ exchanger kinetics in adrenal glomerulosa cells and its activation by angiotensin II. In: *Endocrinology* 127 (1), S. 236–244. DOI: 10.1210/endo-127-1-236.

Conlin, P. R.; Williams, G. H.; Canessa, M. L. (1991): Angiotensin II-induced activation of Na(+)-H+ exchange in adrenal glomerulosa cells is mediated by protein kinase C. In: *Endocrinology* 129 (4), S. 1861–1868. DOI: 10.1210/endo-129-4-1861.

Conn, J. W. (1955): Presidential address. I. Painting background. II. Primary aldosteronism, a new clinical syndrome. In: *The Journal of laboratory and clinical medicine* 45 (1), S. 3–17.

Cooper, M. J.; Hutchins, G. M.; Israel, M. A. (1990): Histogenesis of the human adrenal medulla. An evaluation of the ontogeny of chromaffin and nonchromaffin lineages. In: *The American journal of pathology* 137 (3), S. 605–615.

Cribbs, L. L.; Lee, J. H.; Yang, J.; Satin, J.; Zhang, Y.; Daud, A. et al. (1998): Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca2+ channel gene family. In: *Circulation research* 83 (1), S. 103–109. DOI: 10.1161/01.res.83.1.103.

Crunelli, Vincenzo; Tóth, Tibor I.; Cope, David W.; Blethyn, Kate; Hughes, Stuart W. (2005): The 'window' T-type calcium current in brain dynamics of different behavioural states. In: *The Journal of physiology* 562 (Pt 1), S. 121–129. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.076273.

Curnow, K. M.; Tusie-Luna, M. T.; Pascoe, L.; Natarajan, R.; Gu, J. L.; Nadler, J. L.; White, P. C. (1991): The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 5 (10), S. 1513–1522. DOI: 10.1210/mend-5-10-1513.

Czirják, G.; Fischer, T.; Spät, A.; Lesage, F.; Enyedi, P. (2000): TASK (TWIK-related acid-sensitive K+ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 14 (6), S. 863–874. DOI: 10.1210/mend.14.6.0466.

Czirják, Gábor; Enyedi, Péter (2002): TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 16 (3), S. 621–629. DOI: 10.1210/mend.16.3.0788.

Danielson, P. B. (2002): The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. In: *Current drug metabolism* 3 (6), S. 561–597. DOI: 10.2174/1389200023337054.

Daniil, Georgios; Fernandes-Rosa, Fabio L.; Chemin, Jean; Blesneac, Iulia; Beltrand, Jacques; Polak, Michel et al. (2016): CACNA1H Mutations Are Associated With Different Forms of Primary Aldosteronism. In: *EBioMedicine* 13, S. 225–236. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.10.002.

Debonneville, C.; Flores, S. Y.; Kamynina, E.; Plant, P. J.; Tauxe, C.; Thomas, M. A. et al. (2001): Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. In: *The EMBO journal* 20 (24), S. 7052–7059. DOI: 10.1093/emboj/20.24.7052.

Diego, A. M. G. de; Gandía, L.; García, A. G. (2008): A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. In: *Acta physiologica (Oxford, England)* 192 (2), S. 287–301. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2007.01807.x.

Dolphin, Annette C. (2006): A short history of voltage-gated calcium channels. In: *British journal of pharmacology* 147 Suppl 1, S56-62. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706442.

Drolet, P.; Bilodeau, L.; Chorvatova, A.; Laflamme, L.; Gallo-Payet, N.; Payet, M. D. (1997): Inhibition of the T-type Ca2+ current by the dopamine D1 receptor in rat adrenal glomerulosa cells: requirement of the combined action of the G betagamma protein subunit and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 11 (4), S. 503–514. DOI: 10.1210/mend.11.4.9910.

Duprat, F.; Lesage, F.; Fink, M.; Reyes, R.; Heurteaux, C.; Lazdunski, M. (1997): TASK, a human background K+ channel to sense external pH variations near physiological pH. In: *The EMBO journal* 16 (17), S. 5464–5471. DOI: 10.1093/emboj/16.17.5464.

Durroux, T.; Gallo-Payet, N.; Payet, M. D. (1988): Three components of the calcium current in cultured glomerulosa cells from rat adrenal gland. In: *The Journal of physiology* 404, S. 713–729. DOI: 10.1113/jphysiol.1988.sp017315.

Enyedi, P.; Szabadkai, G.; Horváth, A.; Szilágyi, L.; Gráf, L.; Spät, A. (1994): Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtypes in adrenal glomerulosa cells. In: *Endocrinology* 134 (6), S. 2354–2359. DOI: 10.1210/endo.134.6.8194461.

Evans, R. M. (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. In: *Science (New York, N.Y.)* 240 (4854), S. 889–895. DOI: 10.1126/science.3283939.

Farese, R. V.; Larson, R. E.; Sabir, M. A.; Gomez-Sanchez, C. (1981): Effects of angiotensin-II and potassium on phospholipid metabolism in the adrenal zona glomerulosa. In: *Journal of Biological Chemistry* 256 (21), S. 11093–11097. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)68560-1.

Fedulova, S. A.; Kostyuk, P. G.; Veselovsky, N. S. (1985): Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. In: *The Journal of physiology* 359, S. 431–446. DOI: 10.1113/jphysiol.1985.sp015594.

Fejes-Tóth, G.; Pearce, D.; Náray-Fejes-Tóth, A. (1998): Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (6), S. 2973–2978. DOI: 10.1073/pnas.95.6.2973.

Feldman, Ross D.; Gros, Robert (2013): Vascular effects of aldosterone: sorting out the receptors and the ligands. In: *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 40 (12), S. 916–921. DOI: 10.1111/1440-1681.12157.

Fernandes-Rosa, Fabio L.; Daniil, Georgios; Orozco, Ian J.; Göppner, Corinna; El Zein, Rami; Jain, Vandana et al. (2018): A gain-of-function mutation in the CLCN2 chloride channel gene causes primary aldosteronism. In: *Nature genetics* 50 (3), S. 355–361. DOI: 10.1038/s41588-018-0053-8.

Fernandes-Rosa, Fabio Luiz; Williams, Tracy Ann; Riester, Anna; Steichen, Olivier; Beuschlein, Felix; Boulkroun, Sheerazed et al. (2014): Genetic spectrum and clinical correlates of somatic mutations in aldosterone-producing adenoma. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 64 (2), S. 354–361. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03419.

Fleury, Alain; Mathieu, Axel P.; Ducharme, Lyne; Hales, Dale Buchanan; LeHoux, Jean-Guy (2004): Phosphorylation and function of the hamster adrenal steroidogenic acute regulatory protein (StAR). In: *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 91 (4-5), S. 259–271. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2004.04.010.

Forouzanfar, Mohammad H.; Liu, Patrick; Roth, Gregory A.; Ng, Marie; Biryukov, Stan; Marczak, Laurie et al. (2017): Global Burden of Hypertension and Systolic Blood Pressure of at Least 110 to 115 mm Hg, 1990-2015. In: *JAMA* 317 (2), S. 165–182. DOI: 10.1001/jama.2016.19043.

Fukushima, Y.; Hagiwara, S. (1985): Currents carried by monovalent cations through calcium channels in mouse neoplastic B lymphocytes. In: *The Journal of physiology* 358, S. 255–284. DOI: 10.1113/jphysiol.1985.sp015550.

Fuller, Peter J.; Young, Morag J. (2005): Mechanisms of mineralocorticoid action. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 46 (6), S. 1227–1235. DOI: 10.1161/01.HYP.0000193502.77417.17.

Funder, John W.; Carey, Robert M.; Mantero, Franco; Murad, M. Hassan; Reincke, Martin; Shibata, Hirotaka et al. (2016): The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 101 (5), S. 1889–1916. DOI: 10.1210/jc.2015-4061.

Furukawa, T.; Ito, H.; Nitta, J.; Tsujino, M.; Adachi, S.; Hiroe, M. et al. (1992): Endothelin-1 enhances calcium entry through T-type calcium channels in cultured neonatal rat ventricular myocytes. In: *Circulation research* 71 (5), S. 1242–1253. DOI: 10.1161/01.res.71.5.1242.

Galati, Sandi-Jo; Cheesman, Khadeen C.; Springer-Miller, Ryan; Hopkins, Sarah M.; Krakoff, Lawrence; Bagiella, Emilia et al. (2016): PREVELENCE OF PRIMARY ALDOSTERONISM IN AN URBAN HYPERTENSIVE POPULATION. In: *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* 22 (11), S. 1296–1302. DOI: 10.4158/E161332.OR.

Gazdar, A. F.; Oie, H. K.; Shackleton, C. H.; Chen, T. R.; Triche, T. J.; Myers, C. E. et al. (1990): Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. In: *Cancer research* 50 (17), S. 5488–5496.

Geerling, Joel C.; Loewy, Arthur D. (2009): Aldosterone in the brain. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 297 (3), F559-76. DOI: 10.1152/ajprenal.90399.2008.

Gekle, M.; Golenhofen, N.; Oberleithner, H.; Silbernagl, S. (1996): Rapid activation of Na+/H+ exchange by aldosterone in renal epithelial cells requires Ca2+ and stimulation of a plasma membrane proton conductance. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (19), S. 10500–10504. DOI: 10.1073/pnas.93.19.10500.

Geller, David S.; Zhang, Junhui; Wisgerhof, Max V.; Shackleton, Cedric; Kashgarian, Michael; Lifton, Richard P. (2008): A novel form of human mendelian hypertension featuring nonglucocorticoid-remediable aldosteronism. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93 (8), S. 3117–3123. DOI: 10.1210/jc.2008-0594.

Giroud, C. J.; Stachenko, J.; Venning, E. H. (1956): Secretion of aldosterone by the zona glomerulosa of rat adrenal glands incubated in vitro. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 92 (1), S. 154–158. DOI: 10.3181/00379727-92-22416.

Gomez-Sanchez, Celso E.; Qi, Xin; Velarde-Miranda, Carolina; Plonczynski, Maria W.; Parker, C. Richard; Rainey, William et al. (2014): Development of monoclonal antibodies against human CYP11B1 and CYP11B2. In: *Molecular and cellular endocrinology* 383 (1-2), S. 111–117. DOI: 10.1016/j.mce.2013.11.022.

Gottesman, Rebecca F.; Albert, Marilyn S.; Alonso, Alvaro; Coker, Laura H.; Coresh, Josef; Davis, Sonia M. et al. (2017): Associations Between Midlife Vascular Risk Factors and 25-Year Incident Dementia in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Cohort. In: *JAMA neurology* 74 (10), S. 1246–1254. DOI: 10.1001/jamaneurol.2017.1658.

Goudreault, Marilyn; D'Ambrosio, Lisa M.; Kean, Michelle J.; Mullin, Michael J.; Larsen, Brett G.; Sanchez, Amy et al. (2009): A PP2A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 8 (1), S. 157–171. DOI: 10.1074/mcp.M800266-MCP200.

Gravez, Basile; Tarjus, Antoine; Pelloux, Véronique; Ouvrard-Pascaud, Antoine; Delcayre, Claude; Samuel, Janelise et al. (2015): Aldosterone promotes cardiac endothelial cell proliferation in vivo. In: *Journal of the American Heart Association* 4 (1), e001266. DOI: 10.1161/JAHA.114.001266.

Gschwendt, Michael; Dieterich, Sabine; Rennecke, Joerg; Kittstein, Walter; Mueller, Hans-Joachim; Johannes, Franz-Josef (1996): Inhibition of protein kinase C μ by various inhibitors. Inhibition from protein kinase c isoenzymes. In: *FEBS Letters* 392 (2), S. 77–80. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00785-5.

Gürtler, Florian; Jordan, Katrin; Tegtmeier, Ines; Herold, Janina; Stindl, Julia; Warth, Richard; Bandulik, Sascha (2020): Cellular Pathophysiology of Mutant Voltage-Dependent Ca2+ Channel CACNA1H in Primary Aldosteronism. In: *Endocrinology* 161 (10). DOI: 10.1210/endocr/bqaa135.

Hagiwara, S.; Ozawa, S.; Sand, O. (1975): Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. In: *The Journal of general physiology* 65 (5), S. 617–644. DOI: 10.1085/jgp.65.5.617.

Hattangady, Namita G.; Olala, Lawrence O.; Bollag, Wendy B.; Rainey, William E. (2012): Acute and chronic regulation of aldosterone production. In: *Molecular and cellular endocrinology* 350 (2), S. 151–162. DOI: 10.1016/j.mce.2011.07.034.

Hering, S.; Zangerl-Plessl, E-M; Beyl, S.; Hohaus, A.; Andranovits, S.; Timin, E. N. (2018): Calcium channel gating. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 470 (9), S. 1291–1309. DOI: 10.1007/s00424-018-2163-7.

Horiuchi, T.; Nguyen, T. T.; Cragoe, E. J.; Léan, A. de (1989): Regulation of aldosterone biosynthesis by Na+/H+ antiport: relationships between intracellular pH and angiotensin II. In: *Endocrinology* 124 (4), S. 1925–1931. DOI: 10.1210/endo-124-4-1925.

Hu, Changlong; Rusin, Craig G.; Tan, Zhiyong; Guagliardo, Nick A.; Barrett, Paula Q. (2012): Zona glomerulosa cells of the mouse adrenal cortex are intrinsic electrical oscillators. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (6), S. 2046–2053. DOI: 10.1172/JCI61996.

Hünergardt, Juliana (2018): Untersuchungen zur Interaktion von zellulärer Ca2+- und pH-Homöstase während der Regulation der Aldosteronproduktion. Bachelorarbeit.

Hunyady, L.; Baukal, A. J.; Bor, M.; Ely, J. A.; Catt, K. J. (1990): Regulation of 1,2-diacylglycerol production by angiotensin-II in bovine adrenal glomerulosa cells. In: *Endocrinology* 126 (2), S. 1001–1008. DOI: 10.1210/endo-126-2-1001.

Huynen, Martijn A.; Mühlmeister, Mareike; Gotthardt, Katherina; Guerrero-Castillo, Sergio; Brandt, Ulrich (2016): Evolution and structural organization of the mitochondrial contact site (MICOS) complex and the mitochondrial intermembrane space bridging (MIB) complex. In: *Biochimica et biophysica acta* 1863 (1), S. 91–101. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.10.009.

Hyatt, P. J.; Bhatt, K.; Tait, J. F. (1983): Steroid biosynthesis by zona fasciculata and zona reticularis cells purified from the mammalian adrenal cortex. In: *Journal of steroid biochemistry* 19 (1), S. 953–959. DOI: 10.1016/0022-4731(83)90039-0.

Iftinca, M.; McKay, B. E.; Snutch, T. P.; McRory, J. E.; Turner, R. W.; Zamponi, G. W. (2006): Temperature dependence of T-type calcium channel gating. In: *Neuroscience* 142 (4), S. 1031–1042. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.07.010.

Imagawa, Keiichi; Okayama, Satoshi; Takaoka, Minoru; Kawata, Hiroyuki; Naya, Noriyuki; Nakajima, Tamio et al. (2006): Inhibitory effect of efonidipine on aldosterone synthesis and secretion in human adrenocarcinoma (H295R) cells. In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 47 (1), S. 133–138. DOI: 10.1097/01.fjc.0000197539.12685.f5.

Imminger, Katrin (2016): Germline mutation of voltage-dependent Ca2+-channel CACNA1H associated with primary aldosteronism - a cellular pathophysiological examination. Bachelorarbeit.

Iossifov, Ivan; Ronemus, Michael; Levy, Dan; Wang, Zihua; Hakker, Inessa; Rosenbaum, Julie et al. (2012): De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. In: *Neuron* 74 (2), S. 285–299. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.04.009.

Isom, Daniel G.; Sridharan, Vishwajith; Baker, Rachael; Clement, Sarah T.; Smalley, David M.; Dohlman, Henrik G. (2013): Protons as second messenger regulators of G protein signaling. In: *Molecular cell* 51 (4), S. 531–538. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.07.012.

Jagannathan, Suchitra; Punt, Emma L.; Gu, Yuchun; Arnoult, Christophe; Sakkas, Denny; Barratt, Christopher L. R.; Publicover, Stephen J. (2002): Identification and localization of T-type voltage-operated calcium channel subunits in human male germ cells. Expression of multiple isoforms. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (10), S. 8449–8456. DOI: 10.1074/jbc.M105345200.

Johar, Sofian; Cave, Alison C.; Narayanapanicker, Anilkumar; Grieve, David J.; Shah, Ajay M. (2006): Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (9), S. 1546–1548. DOI: 10.1096/fj.05-4642fje.

Jones, P. M.; Sayed, S. B.; Persaud, S. J.; Burns, C. J.; Gyles, S.; Whitehouse, B. J. (2000): Cyclic AMP-induced expression of steroidogenic acute regulatory protein is dependent upon phosphoprotein phosphatase activities. In: *Journal of molecular endocrinology* 24 (2), S. 233–239. DOI: 10.1677/jme.0.0240233.

Junttila, Melissa R.; Puustinen, Pietri; Niemelä, Minna; Ahola, Raija; Arnold, Hugh; Böttzauw, Trine et al. (2007): CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. In: *Cell* 130 (1), S. 51–62. DOI: 10.1016/j.cell.2007.04.044.

Kawamoto, T.; Mitsuuchi, Y.; Toda, K.; Yokoyama, Y.; Miyahara, K.; Miura, S. et al. (1992): Role of steroid 11 beta-hydroxylase and steroid 18-hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (4), S. 1458–1462. DOI: 10.1073/pnas.89.4.1458.

Käyser, Sabine C.; Deinum, Jaap; Grauw, Wim Jc de; Schalk, Bianca Wm; Bor, Hans Jhj; Lenders, Jacques Wm et al. (2018): Prevalence of primary aldosteronism in primary care: a cross-sectional study. In: *The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners* 68 (667), e114-e122. DOI: 10.3399/bjgp18X694589.

Kolla, V.; Litwack, G. (2000): Transcriptional regulation of the human Na/K ATPase via the human mineralocorticoid receptor. In: *Molecular and cellular biochemistry* 204 (1-2), S. 35–40. DOI: 10.1023/a:1007009700377.

Koob, Sebastian; Barrera, Miguel; Anand, Ruchika; Reichert, Andreas S. (2015): The non-glycosylated isoform of MIC26 is a constituent of the mammalian MICOS complex and promotes formation of crista junctions. In: *Biochimica et biophysica acta* 1853 (7), S. 1551–1563. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.03.004.

Kopec, Wojciech; Loubet, Bastien; Poulsen, Hanne; Khandelia, Himanshu (2014): Molecular mechanism of Na(+),K(+)-ATPase malfunction in mutations characteristic of adrenal hypertension. In: *Biochemistry* 53 (4), S. 746–754. DOI: 10.1021/bi401425g.

Kozjak-Pavlovic, Vera (2017): The MICOS complex of human mitochondria. In: *Cell and tissue research* 367 (1), S. 83–93. DOI: 10.1007/s00441-016-2433-7.

Kramer, R. E.; Robinson, T. V.; Schneider, E. G.; Smith, T. G. (2000): Direct modulation of basal and angiotensin II-stimulated aldosterone secretion by hydrogen ions. In: *The Journal of endocrinology* 166 (1), S. 183–194. DOI: 10.1677/joe.0.1660183.

Krozowski, Z. S.; Funder, J. W. (1983): Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone-binding species have identical intrinsic steroid specificity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (19), S. 6056–6060. DOI: 10.1073/pnas.80.19.6056.

Lachance, Y.; Luu-The, V.; Labrie, C.; Simard, J.; Dumont, M.; Launoit, Y. de et al. (1990): Characterization of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase gene and its expression in mammalian cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 265 (33), S. 20469–20475. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)30528-8.

Lafferty, A. R.; Torpy, D. J.; Stowasser, M.; Taymans, S. E.; Lin, J. P.; Huggard, P. et al. (2000): A novel genetic locus for low renin hypertension: familial hyperaldosteronism type II maps to chromosome 7 (7p22). In: *Journal of medical genetics* 37 (11), S. 831–835. DOI: 10.1136/jmg.37.11.831.

Lamant, Matthieu; Smih, Fatima; Harmancey, Romain; Philip-Couderc, Pierre; Pathak, Atul; Roncalli, Jerome et al. (2006): ApoO, a novel apolipoprotein, is an original glycoprotein up-regulated by diabetes in human heart. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (47), S. 36289–36302. DOI: 10.1074/jbc.M510861200.

LeHoux, J. G.; Dupuis, G.; Lefebvre, A. (2000): Regulation of CYP11B2 gene expression by protein kinase C. In: *Endocrine research* 26 (4), S. 1027–1031. DOI: 10.3109/07435800009048634.

LeHoux, J. G.; Dupuis, G.; Lefebvre, A. (2001): Control of CYP11B2 gene expression through differential regulation of its promoter by atypical and conventional protein kinase C isoforms. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (11), S. 8021–8028. DOI: 10.1074/jbc.M009495200.

LeHoux, Jean-Guy; Lefebvre, Andrée (2006): Novel protein kinase C-epsilon inhibits human CYP11B2 gene expression through ERK1/2 signalling pathway and JunB. In: *Journal of molecular endocrinology* 36 (1), S. 51–64. DOI: 10.1677/jme.1.01908.

Lenzini, Livia; Prisco, Selene; Caroccia, Brasilina; Rossi, Gian Paolo (2018): Saga of Familial Hyperaldosteronism: Yet a New Channel. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 71 (6), S. 1010–1014. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11150.

Lenzini, Livia; Rossitto, Giacomo; Maiolino, Giuseppe; Letizia, Claudio; Funder, John W.; Rossi, Gian Paolo (2015): A Meta-Analysis of Somatic KCNJ5 K(+) Channel Mutations In 1636 Patients With an Aldosterone-Producing Adenoma. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 100 (8), E1089-95. DOI: 10.1210/jc.2015-2149.

Lewington, Sarah; Clarke, Robert; Qizilbash, Nawab; Peto, Richard; Collins, Rory (2002): Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. In: *Lancet (London, England)* 360 (9349), S. 1903–1913. DOI: 10.1016/s0140-6736(02)11911-8.

Lieberman, Seymour; Lin, Yong Yeng (2001): Reflections on sterol sidechain cleavage process catalyzed by cytochrome P450scc. In: *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 78 (1), S. 1–14. DOI: 10.1016/S0960-0760(01)00068-1.

Lifton, R. P.; Dluhy, R. G.; Powers, M.; Rich, G. M.; Cook, S.; Ulick, S.; Lalouel, J. M. (1992): A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. In: *Nature* 355 (6357), S. 262–265. DOI: 10.1038/355262a0.

Lin, D.; Sugawara, T.; Strauss, J. F.; Clark, B. J.; Stocco, D. M.; Saenger, P. et al. (1995): Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. In: *Science (New York, N.Y.)* 267 (5205), S. 1828–1831. DOI: 10.1126/science.7892608.

Loffing, J.; Zecevic, M.; Féraille, E.; Kaissling, B.; Asher, C.; Rossier, B. C. et al. (2001): Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 280 (4), F675-82. DOI: 10.1152/ajprenal.2001.280.4.F675.

Lombès, M.; Alfaidy, N.; Eugene, E.; Lessana, A.; Farman, N.; Bonvalet, J. P. (1995): Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. In: *Circulation* 92 (2), S. 175–182. DOI: 10.1161/01.cir.92.2.175.

Lotshaw, D. P. (1997): Characterization of angiotensin II-regulated K+ conductance in rat adrenal glomerulosa cells. In: *The Journal of membrane biology* 156 (3), S. 261–277. DOI: 10.1007/s002329900206.

Lotshaw, David P. (2001): Role of membrane depolarization and T-type Ca2+ channels in angiotensin II and K+ stimulated aldosterone secretion. In: *Molecular and cellular endocrinology* 175 (1-2), S. 157–171. DOI: 10.1016/S0303-7207(01)00384-7.

Lotshaw, David P. (2006): Biophysical and pharmacological characteristics of native two-pore domain TASK channels in rat adrenal glomerulosa cells. In: *The Journal of membrane biology* 210 (1), S. 51–70. DOI: 10.1007/s00232-005-7012-x.

Lu, H. K.; Fern, R. J.; Nee, J. J.; Barrett, P. Q. (1994): Ca(2+)-dependent activation of T-type Ca2+ channels by calmodulin-dependent protein kinase II. In: *The American journal of physiology* 267 (1 Pt 2), F183-9. DOI: 10.1152/ajprenal.1994.267.1.F183.

Lu, Liangying; Suzuki, Takashi; Yoshikawa, Yosuke; Murakami, Osamu; Miki, Yasuhiro; Moriya, Takuya et al. (2004): Nur-related factor 1 and nerve growth factor-induced clone B in human adrenal cortex and its disorders. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89 (8), S. 4113–4118. DOI: 10.1210/jc.2004-0069.

Lux, H. D.; Carbone, E.; Zucker, H. (1990): Na+ currents through low-voltage-activated Ca2+ channels of chick sensory neurones: block by external Ca2+ and Mg2+. In: *The Journal of physiology* 430, S. 159–188. DOI: 10.1113/jphysiol.1990.sp018287.

Manna, Pulak R.; Huhtaniemi, Ilpo T.; Stocco, Douglas M. (2009): Mechanisms of protein kinase C signaling in the modulation of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated steroidogenesis in mouse gonadal cells. In: *Endocrinology* 150 (7), S. 3308–3317. DOI: 10.1210/en.2008-1668.

Mao, Jinzhe; Wu, Jianping; Chen, Fuxue; Wang, Xueren; Jiang, Chun (2003): Inhibition of G-protein-coupled inward rectifying K+ channels by intracellular acidosis. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (9), S. 7091–7098. DOI: 10.1074/jbc.M211461200.

Marksteiner, R.; Schurr, P.; Berjukow, S.; Margreiter, E.; Perez-Reyes, E.; Hering, S. (2001): Inactivation determinants in segment IIIS6 of Ca(v)3.1. In: *The Journal of physiology* 537 (Pt 1), S. 27–34. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2001.0027k.x.

Martin, R. L.; Lee, J. H.; Cribbs, L. L.; Perez-Reyes, E.; Hanck, D. A. (2000): Mibefradil block of cloned T-type calcium channels. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 295 (1), S. 302–308.

Mason, J. I.; Rainey, W. E. (1987): Steroidogenesis in the human fetal adrenal: a role for cholesterol synthesized de novo. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 64 (1), S. 140–147. DOI: 10.1210/jcem-64-1-140.

Matsuda, H. (1986): Sodium conductance in calcium channels of guinea-pig ventricular cells induced by removal of external calcium ions. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 407 (5), S. 465–475. DOI: 10.1007/BF00657502.

McCabe, Edward R. B. (2007): DAX1: Increasing complexity in the roles of this novel nuclear receptor. In: *Molecular and cellular endocrinology* 265-266, S. 179–182. DOI: 10.1016/j.mce.2006.12.017.

McCarthy, R. T.; Isales, C. M.; Bollag, W. B.; Rasmussen, H.; Barrett, P. Q. (1990): Atrial natriuretic peptide differentially modulates T- and L-type calcium channels. In: *The American journal of physiology* 258 (3 Pt 2), F473-8. DOI: 10.1152/ajprenal.1990.258.3.F473.

McCormick, James A.; Bhalla, Vivek; Pao, Alan C.; Pearce, David (2005): SGK1: a rapid aldosterone-induced regulator of renal sodium reabsorption. In: *Physiology (Bethesda, Md.)* 20, S. 134–139. DOI: 10.1152/physiol.00053.2004.

Mellor, H.; Parker, P. J. (1998): The extended protein kinase C superfamily. In: *The Biochemical journal* 332 (Pt 2), S. 281–292. DOI: 10.1042/bj3320281.

Mingo Alemany, María Carmen de; Mifsud Grau, Luis; Moreno Macián, Francisca; Ferrer Lorente, Belén; León Cariñena, Sara (2020): A de novo CACNA1D missense mutation in a patient with congenital hyperinsulinism, primary hyperaldosteronism and hypotonia. In: *Channels (Austin, Tex.)* 14 (1), S. 175–180. DOI: 10.1080/19336950.2020.1761171.

Monticone, Silvia; Bandulik, Sascha; Stindl, Julia; Zilbermint, Mihail; Dedov, Ivan; Mulatero, Paolo et al. (2015): A case of severe hyperaldosteronism caused by a de novo mutation affecting a critical salt bridge Kir3.4 residue. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 100 (1), E114-8. DOI: 10.1210/jc.2014-3636.

Monticone, Silvia; Burrello, Jacopo; Tizzani, Davide; Bertello, Chiara; Viola, Andrea; Buffolo, Fabrizio et al. (2017): Prevalence and Clinical Manifestations of Primary Aldosteronism Encountered in Primary Care Practice. In: *Journal of the American College of Cardiology* 69 (14), S. 1811–1820. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.01.052.

Monticone, Silvia; Hattangady, Namita G.; Penton, David; Isales, Carlos M.; Edwards, Michael A.; Williams, Tracy A. et al. (2013): a Novel Y152C KCNJ5 mutation responsible for familial hyperaldosteronism type III. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98 (11), E1861-5. DOI: 10.1210/jc.2013-2428.

Mulatero, Paolo; Stowasser, Michael; Loh, Keh-Chuan; Fardella, Carlos E.; Gordon, Richard D.; Mosso, Lorena et al. (2004): Increased diagnosis of primary aldosteronism, including surgically correctable forms, in centers from five continents. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89 (3), S. 1045–1050. DOI: 10.1210/jc.2003-031337.

Mulatero, Paolo; Tauber, Philipp; Zennaro, Maria-Christina; Monticone, Silvia; Lang, Katharina; Beuschlein, Felix et al. (2012): KCNJ5 mutations in European families with nonglucocorticoid remediable familial hyperaldosteronism. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 59 (2), S. 235–240. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.183996.

Muller, Olivier G.; Parnova, Rimma G.; Centeno, Gabriel; Rossier, Bernard C.; Firsov, Dmitri; Horisberger, Jean-Daniel (2003): Mineralocorticoid effects in the kidney: correlation between alphaENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA expression and urinary excretion of Na+ and K+. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 14 (5), S. 1107–1115. DOI: 10.1097/01.asn.0000061777.67332.77.

Müller, Torsten; Kalxdorf, Mathias; Longuespée, Rémi; Kazdal, Daniel N.; Stenzinger, Albrecht; Krijgsveld, Jeroen (2020): Automated sample preparation with SP3 for low-input clinical proteomics. In: *Molecular systems biology* 16 (1), e9111. DOI: 10.15252/msb.20199111.

Musch, Mark W.; Lucioni, Alvaro; Chang, Eugene B. (2008): Aldosterone regulation of intestinal Na absorption involves SGK-mediated changes in NHE3 and Na+ pump activity. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 295 (5), G909-19. DOI: 10.1152/ajpgi.90312.2008.

Nakano, S.; Carvallo, P.; Rocco, S.; Aguilera, G. (1990): Role of protein kinase C on the steroidogenic effect of angiotensin II in the rat adrenal glomerulosa cell. In: *Endocrinology* 126 (1), S. 125–133. DOI: 10.1210/endo-126-1-125.

Nanba, Kazutaka; Blinder, Amy R.; Rege, Juilee; Hattangady, Namita G.; Else, Tobias; Liu, Chia-Jen et al. (2020): Somatic CACNA1H Mutation As a Cause of Aldosterone-Producing Adenoma. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 75 (3), S. 645–649. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14349.

Nanba, Kazutaka; Omata, Kei; Else, Tobias; Beck, Peter C. C.; Nanba, Aya T.; Turcu, Adina F. et al. (2018): Targeted Molecular Characterization of Aldosterone-Producing Adenomas in White Americans. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 103 (10), S. 3869–3876. DOI: 10.1210/jc.2018-01004.

Nanba, Kazutaka; Omata, Kei; Gomez-Sanchez, Celso E.; Stratakis, Constantine A.; Demidowich, Andrew P.; Suzuki, Mari et al. (2019): Genetic Characteristics of Aldosterone-Producing Adenomas in Blacks. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 73 (4), S. 885–892. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12070.

Nehme, Ali; Zouein, Fouad A.; Zayeri, Zeinab Deris; Zibara, Kazem (2019): An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology. In: *Journal of cardiovascular development and disease* 6 (2). DOI: 10.3390/jcdd6020014.

Newton, Alexandra C. (2018): Protein kinase C as a tumor suppressor. In: *Seminars in Cancer Biology* 48, S. 18–26. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.04.017.

Nishimoto, Koshiro; Nakagawa, Ken; Li, Dan; Kosaka, Takeo; Oya, Mototsugu; Mikami, Shuji et al. (2010): Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95 (5), S. 2296–2305. DOI: 10.1210/jc.2009-2010.

Nishimoto, Koshiro; Seki, Tsugio; Kurihara, Isao; Yokota, Kenichi; Omura, Masao; Nishikawa, Tetsuo et al. (2016): Case Report: Nodule Development From Subcapsular Aldosterone-Producing Cell Clusters Causes Hyperaldosteronism. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 101 (1), S. 6–9. DOI: 10.1210/jc.2015-3285.

Nishimoto, Koshiro; Tomlins, Scott A.; Kuick, Rork; Cani, Andi K.; Giordano, Thomas J.; Hovelson, Daniel H. et al. (2015): Aldosterone-stimulating somatic gene mutations are common in normal adrenal glands. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (33), E4591-9. DOI: 10.1073/pnas.1505529112.

Nogueira, Edson F.; Rainey, William E. (2010): Regulation of aldosterone synthase by activator transcription factor/cAMP response element-binding protein family members. In: *Endocrinology* 151 (3), S. 1060–1070. DOI: 10.1210/en.2009-0977.

Nowycky, M. C.; Fox, A. P.; Tsien, R. W. (1985): Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. In: *Nature* 316 (6027), S. 440–443. DOI: 10.1038/316440a0.

Odermatt, A.; Arnold, P.; Frey, F. J. (2001): The intracellular localization of the mineralocorticoid receptor is regulated by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (30), S. 28484–28492. DOI: 10.1074/jbc.M100374200.

Oki, Kenji; Plonczynski, Maria W.; Lam, Milay Luis; Gomez-Sanchez, Elise P.; Gomez-Sanchez, Celso E. (2012): The potassium channel, Kir3.4 participates in angiotensin II-stimulated aldosterone production by a human adrenocortical cell line. In: *Endocrinology* 153 (9), S. 4328–4335. DOI: 10.1210/en.2012-1241.

Olala, Lawrence O.; Choudhary, Vivek; Johnson, Maribeth H.; Bollag, Wendy B. (2014a): Angiotensin II-induced protein kinase D activates the ATF/CREB family of transcription factors and promotes StAR mRNA expression. In: *Endocrinology* 155 (7), S. 2524–2533. DOI: 10.1210/en.2013-1485.

Olala, Lawrence O.; Shapiro, Brian A.; Merchen, Todd C.; Wynn, James J.; Bollag, Wendy B. (2014b): Protein kinase C and Src family kinases mediate angiotensin II-induced protein kinase D activation and acute aldosterone production. In: *Molecular and cellular endocrinology* 392 (1-2), S. 173–181. DOI: 10.1016/j.mce.2014.05.015.

Omata, Kei; Anand, Sharath K.; Hovelson, Daniel H.; Liu, Chia-Jen; Yamazaki, Yuto; Nakamura, Yasuhiro et al. (2017): Aldosterone-Producing Cell Clusters Frequently Harbor Somatic Mutations and Accumulate With Age in Normal Adrenals. In: *Journal of the Endocrine Society* 1 (7), S. 787–799. DOI: 10.1210/js.2017-00134.

Omata, Kei; Satoh, Fumitoshi; Morimoto, Ryo; Ito, Sadayoshi; Yamazaki, Yuto; Nakamura, Yasuhiro et al. (2018): Cellular and Genetic Causes of Idiopathic Hyperaldosteronism. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 72 (4), S. 874–880. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11086.

O'Roak, Brian J.; Vives, Laura; Girirajan, Santhosh; Karakoc, Emre; Krumm, Niklas; Coe, Bradley P. et al. (2012): Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. In: *Nature* 485 (7397), S. 246–250. DOI: 10.1038/nature10989.

Osipenko, O. N.; Várnai, P.; Mike, A.; Spät, A.; Vizi, E. S. (1994): Dopamine blocks T-type calcium channels in cultured rat adrenal glomerulosa cells. In: *Endocrinology* 134 (1), S. 511–514. DOI: 10.1210/endo.134.1.7903936.

Pallan, Pradeep S.; Wang, Chunxue; Lei, Li; Yoshimoto, Francis K.; Auchus, Richard J.; Waterman, Michael R. et al. (2015): Human Cytochrome P450 21A2, the Major Steroid 21-Hydroxylase: STRUCTURE OF THE ENZYME·PROGESTERONE SUBSTRATE COMPLEX AND RATE-LIMITING C-H BOND CLEAVAGE. In: *The Journal of biological chemistry* 290 (21), S. 13128–13143. DOI: 10.1074/jbc.M115.646307.

Park, Hyun-Jee; Park, So-Jung; Ahn, Eun-Joo; Lee, So-Young; Seo, Haengsoo; Lee, Jung-Ha (2013): Asp residues of the Glu-Glu-Asp-Asp pore filter contribute to ion permeation and selectivity of the Ca(v)3.2 T-type channel. In: *Cell calcium* 54 (3), S. 226–235. DOI: 10.1016/j.ceca.2013.06.006.

Paul, Martin; Poyan Mehr, Ali; Kreutz, Reinhold (2006): Physiology of local renin-angiotensin systems. In: *Physiological reviews* 86 (3), S. 747–803. DOI: 10.1152/physrev.00036.2005.

Payne, Anita H.; Hales, Dale B. (2004): Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. In: *Endocrine reviews* 25 (6), S. 947–970. DOI: 10.1210/er.2003-0030.

Perez-Reyes, Edward (2003): Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. In: *Physiological reviews* 83 (1), S. 117–161. DOI: 10.1152/physrev.00018.2002.

Peter, M.; Dubuis, J. M.; Sippell, W. G. (1999): Disorders of the aldosterone synthase and steroid 11beta-hydroxylase deficiencies. In: *Hormone research* 51 (5), S. 211–222. DOI: 10.1159/000023374.

Peter, M.; Viemann, M.; Partsch, C. J.; Sippell, W. G. (1998): Congenital adrenal hypoplasia: clinical spectrum, experience with hormonal diagnosis, and report on new point mutations of the DAX-1 gene. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83 (8), S. 2666–2674. DOI: 10.1210/jcem.83.8.5027.

Petrunak, Elyse M.; DeVore, Natasha M.; Porubsky, Patrick R.; Scott, Emily E. (2014): Structures of human steroidogenic cytochrome P450 17A1 with substrates. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (47), S. 32952–32964. DOI: 10.1074/jbc.M114.610998.

Pezzi, V.; Clyne, C. D.; Ando, S.; Mathis, J. M.; Rainey, W. E. (1997): Ca(2+)-regulated expression of aldosterone synthase is mediated by calmodulin and calmodulin-dependent protein kinases. In: *Endocrinology* 138 (2), S. 835–838. DOI: 10.1210/endo.138.2.5032.

Pezzi, Vincenzo; Clark, Barbara J.; Ando, Sebastiano; Stocco, Douglas M.; Rainey, William E. (1996): Role of Calmodulin-dependent protein kinase II in the acute stimulation of aldosterone production. In: *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 58 (4), S. 417–424. DOI: 10.1016/0960-0760(96)00052-0.

Pinggera, Alexandra; Lieb, Andreas; Benedetti, Bruno; Lampert, Michaela; Monteleone, Stefania; Liedl, Klaus R. et al. (2015): CACNA1D de novo mutations in autism spectrum disorders activate Cav1.3 L-type calcium channels. In: *Biological psychiatry* 77 (9), S. 816–822. DOI: 10.1016/j.biopsych.2014.11.020.

Pinggera, Alexandra; Mackenroth, Luisa; Rump, Andreas; Schallner, Jens; Beleggia, Filippo; Wollnik, Bernd; Striessnig, Jörg (2017): New gain-of-function mutation shows CACNA1D as recurrently mutated gene in autism spectrum disorders and epilepsy. In: *Human molecular genetics* 26 (15), S. 2923–2932. DOI: 10.1093/hmg/ddx175.

Pinggera, Alexandra; Negro, Giulia; Tuluc, Petronel; Brown, Morris J.; Lieb, Andreas; Striessnig, Jörg (2018): Gating defects of disease-causing de novo mutations in Cav1.3 Ca2+ channels. In: *Channels (Austin, Tex.)* 12 (1), S. 388–402. DOI: 10.1080/19336950.2018.1546518.

Pralong, W. F.; Hunyady, L.; Várnai, P.; Wollheim, C. B.; Spät, A. (1992): Pyridine nucleotide redox state parallels production of aldosterone in potassium-stimulated adrenal glomerulosa cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (1), S. 132–136. DOI: 10.1073/pnas.89.1.132.

Queisser, Nina; Schupp, Nicole (2012): Aldosterone, oxidative stress, and NF-κB activation in hypertension-related cardiovascular and renal diseases. In: *Free radical biology & medicine* 53 (2), S. 314–327. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.011.

Quinn, S. J.; Brauneis, U.; Tillotson, D. L.; Cornwall, M. C.; Williams, G. H. (1992): Calcium channels and control of cytosolic calcium in rat and bovine zona glomerulosa cells. In: *The American journal of physiology* 262 (3 Pt 1), C598-606. DOI: 10.1152/ajpcell.1992.262.3.C598.

Quinn, S. J.; Cornwall, M. C.; Williams, G. H. (1987): Electrical properties of isolated rat adrenal glomerulosa and fasciculata cells. In: *Endocrinology* 120 (3), S. 903–914. DOI: 10.1210/endo-120-3-903.

Radke, K. J.; Taylor, R. E.; Schneider, E. G. (1986): Effect of hydrogen ion concentration on aldosterone secretion by isolated perfused canine adrenal glands. In: *The Journal of endocrinology* 110 (2), S. 293–301. DOI: 10.1677/joe.0.1100293.

Rainey, William E.; Nakamura, Yasuhiro (2008): Regulation of the adrenal androgen biosynthesis. In: *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 108 (3-5), S. 281–286. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2007.09.015.

Reimer, Esther N.; Walenda, Gudrun; Seidel, Eric; Scholl, Ute I. (2016): CACNA1H(M1549V) Mutant Calcium Channel Causes Autonomous Aldosterone Production in HAC15 Cells and Is Inhibited by Mibefradil. In: *Endocrinology* 157 (8), S. 3016–3022. DOI: 10.1210/en.2016-1170.

Reul, J. M.; Kloet, E. R. de (1985): Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. In: *Endocrinology* 117 (6), S. 2505–2511. DOI: 10.1210/endo-117-6-2505.

Rhéaume, E.; Lachance, Y.; Zhao, H. F.; Breton, N.; Dumont, M.; Launoit, Y. de et al. (1991): Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human adrenals and gonads. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 5 (8), S. 1147–1157. DOI: 10.1210/mend-5-8-1147.

Rimoldi, Stefano F.; Scherrer, Urs; Messerli, Franz H. (2014): Secondary arterial hypertension: when, who, and how to screen? In: *European heart journal* 35 (19), S. 1245–1254. DOI: 10.1093/eurheartj/eht534.

Robertson, N. M.; Schulman, G.; Karnik, S.; Alnemri, E.; Litwack, G. (1993): Demonstration of nuclear translocation of the mineralocorticoid receptor (MR) using an anti-MR antibody and confocal laser scanning microscopy. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 7 (9), S. 1226–1239. DOI: 10.1210/mend.7.9.8247024.

Rogerson, Fraser M.; Fuller, Peter J. (2000): Mineralocorticoid action. In: *Steroids* 65 (2), S. 61–73. DOI: 10.1016/S0039-128X(99)00087-2.

Romero, Damian G.; Welsh, Bronwyn L.; Gomez-Sanchez, Elise P.; Yanes, Licy L.; Rilli, Silvia; Gomez-Sanchez, Celso E. (2006): Angiotensin II-mediated protein kinase D activation stimulates aldosterone and cortisol secretion in H295R human adrenocortical cells. In: *Endocrinology* 147 (12), S. 6046–6055. DOI: 10.1210/en.2006-0794.

Rossi, Gian Paolo; Bernini, Giampaolo; Caliumi, Chiara; Desideri, Giovambattista; Fabris, Bruno; Ferri, Claudio et al. (2006): A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. In: *Journal of the American College of Cardiology* 48 (11), S. 2293–2300. DOI: 10.1016/j.jacc.2006.07.059.

Rossier, M. F.; Aptel, H. B.; Python, C. P.; Burnay, M. M.; Vallotton, M. B.; Capponi, A. M. (1995): Inhibition of low threshold calcium channels by angiotensin II in adrenal glomerulosa cells through activation of protein kinase C. In: *Journal of Biological Chemistry* 270 (25), S. 15137–15142. DOI: 10.1074/jbc.270.25.15137.

Rossier, M. F.; Burnay, M. M.; Brandenburger, Y.; Cherradi, N.; Vallotton, M. B.; Capponi, A. M. (1996a): Sources and sites of action of calcium in the regulation of aldosterone biosynthesis. In: *Endocrine research* 22 (4), S. 579–588. DOI: 10.1080/07435809609043750.

Rossier, M. F.; Burnay, M. M.; Vallotton, M. B.; Capponi, A. M. (1996b): Distinct functions of T- and L-type calcium channels during activation of bovine adrenal glomerulosa cells. In: *Endocrinology* 137 (11), S. 4817–4826. DOI: 10.1210/endo.137.11.8895352.

Rossier, M. F.; Ertel, E. A.; Vallotton, M. B.; Capponi, A. M. (1998): Inhibitory action of mibefradil on calcium signaling and aldosterone synthesis in bovine adrenal glomerulosa cells. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 287 (3), S. 824–831.

Rovio, Suvi P.; Pahkala, Katja; Nevalainen, Jaakko; Juonala, Markus; Salo, Pia; Kähönen, Mika et al. (2017): Cardiovascular Risk Factors From Childhood and Midlife Cognitive Performance: The Young Finns Study. In: *Journal of the American College of Cardiology* 69 (18), S. 2279–2289. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.02.060.

Rupprecht, R.; Arriza, J. L.; Spengler, D.; Reul, J. M.; Evans, R. M.; Holsboer, F.; Damm, K. (1993): Transactivation and synergistic properties of the mineralocorticoid receptor: relationship to the glucocorticoid receptor. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 7 (4), S. 597–603. DOI: 10.1210/mend.7.4.8388999.

Sakai, R. R.; Ma, L. Y.; Zhang, D. M.; McEwen, B. S.; Fluharty, S. J. (1996): Intracerebral administration of mineralocorticoid receptor antisense oligonucleotides attenuate adrenal steroid-induced salt appetite in rats. In: *Neuroendocrinology* 64 (6), S. 425–429. DOI: 10.1159/000127148.

Schiebler, Theodor Heinrich (2005): Anatomie. Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs ; [Neue Approbationsordnung. 9., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin: Springer Medizin (Springer-Lehrbuch).

Schläger, Michaela (2017): Untersuchungen zur Bedeutung des zellulären pH-Werts und der NHE-Aktivität für die Aldoste-ronsynthese. Bachelorarbeit.

Scholl, Ute I.; Goh, Gerald; Stölting, Gabriel; Oliveira, Regina Campos de; Choi, Murim; Overton, John D. et al. (2013): Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. In: *Nature genetics* 45 (9), S. 1050–1054. DOI: 10.1038/ng.2695.

Scholl, Ute I.; Nelson-Williams, Carol; Yue, Peng; Grekin, Roger; Wyatt, Robert J.; Dillon, Michael J. et al. (2012): Hypertension with or without adrenal hyperplasia due to different inherited mutations in the potassium channel KCNJ5. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (7), S. 2533–2538. DOI: 10.1073/pnas.1121407109.

Scholl, Ute I.; Stölting, Gabriel; Nelson-Williams, Carol; Vichot, Alfred A.; Choi, Murim; Loring, Erin et al. (2015): Recurrent gain of function mutation in calcium channel CACNA1H causes early-onset hypertension with primary aldosteronism. In: *eLife* 4, e06315. DOI: 10.7554/eLife.06315.

Scholl, Ute I.; Stölting, Gabriel; Schewe, Julia; Thiel, Anne; Tan, Hua; Nelson-Williams, Carol et al. (2018): CLCN2 chloride channel mutations in familial hyperaldosteronism type II. In: *Nature genetics* 50 (3), S. 349–354. DOI: 10.1038/s41588-018-0048-5.

Schrier, A. D.; Wang, H.; Talley, E. M.; Perez-Reyes, E.; Barrett, P. Q. (2001): alpha1H T-type Ca2+ channel is the predominant subtype expressed in bovine and rat zona glomerulosa. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 280 (2), C265-72. DOI: 10.1152/ajpcell.2001.280.2.C265.

Schroeder, J. E.; Fischbach, P. S.; McCleskey, E. W. (1990): T-type calcium channels: heterogeneous expression in rat sensory neurons and selective modulation by phorbol esters. In: *J. Neurosci.* 10 (3), S. 947–951. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.10-03-00947.1990.

Scranton, Kyle; John, Scott; Escobar, Ariel; Goldhaber, Joshua I.; Ottolia, Michela (2020): Modulation of the cardiac Na+-Ca2+ exchanger by cytoplasmic protons: Molecular mechanisms and physiological implications. In: *Cell calcium* 87, S. 102140. DOI: 10.1016/j.ceca.2019.102140.

Seidel, Eric; Schewe, Julia; Zhang, Junhui; Dinh, Hoang an; Forslund, Sofia K.; Markó, Lajos et al. (2021): Enhanced Ca2+ signaling, mild primary aldosteronism, and hypertension in a familial hyperaldosteronism mouse model (Cacna1hM1560V/+). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (17). DOI: 10.1073/pnas.2014876118.

Seltzer, William K.; Firminger, Harlan; Klein, Jerod; Pike, Adrian; Fennessey, Paul; McCabe, Edward R.B. (1985): Adrenal dysfunction in glycerol kinase deficiency. In: *Biochemical Medicine* 33 (2), S. 189–199. DOI: 10.1016/0006-2944(85)90027-4.

Semenova, N. A.; Ryzhkova, O. R.; Strokova, T. V.; Taran, N. N. (2018): Tretiĭ sluchaĭ sindroma pervichnogo al'dosteronizma, sudorog i nevrologicheskikh narusheniĭ (PASNA), obuslovlennogo variantom mutatsii de novo v gene CACNA1D. In: *Zhurnal nevrologii i psikhiatrii imeni S.S. Korsakova* 118 (12), S. 49–52. DOI: 10.17116/jnevro201811812149.

Shapiro, Brian A.; Olala, Lawrence; Arun, Senthil Nathan; Parker, Peter M.; George, Mariya V.; Bollag, Wendy B. (2010): Angiotensin II-activated protein kinase D mediates acute aldosterone secretion. In: *Molecular and cellular endocrinology* 317 (1-2), S. 99–105. DOI: 10.1016/j.mce.2009.11.017.

Shepherd, R. M.; Williams, G. H.; Quinn, S. J. (1992): Regulation of intracellular pH in single rat zona glomerulosa cells. In: *The American journal of physiology* 262 (1 Pt 1), C182-90. DOI: 10.1152/ajpcell.1992.262.1.C182.

Shuba, Yaroslav M. (2014): Models of calcium permeation through T-type channels. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 466 (4), S. 635–644. DOI: 10.1007/s00424-013-1437-3.

Snyder, Peter M.; Olson, Diane R.; Thomas, Brittany C. (2002): Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na+ channel. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (1), S. 5–8. DOI: 10.1074/jbc.C100623200.

Souza, Ivana A.; Gandini, Maria A.; Wan, Miranda M.; Zamponi, Gerald W. (2016): Two heterozygous Cav3.2 channel mutations in a pediatric chronic pain patient: recording condition-dependent biophysical effects. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 468 (4), S. 635–642. DOI: 10.1007/s00424-015-1776-3.

Spät, András; Hunyady, László (2004): Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. In: *Physiological reviews* 84 (2), S. 489–539. DOI: 10.1152/physrev.00030.2003.

Stephens, Robert F.; Guan, W.; Zhorov, Boris S.; Spafford, J. David (2015): Selectivity filters and cysteine-rich extracellular loops in voltage-gated sodium, calcium, and NALCN channels. In: *Frontiers in physiology* 6, S. 153. DOI: 10.3389/fphys.2015.00153.

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. In: *Endocrinology* 156 (12), S. 4582–4591. DOI: 10.1210/en.2015-1466.

Stocco, D. M. (2001): StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. In: *Annual review of physiology* 63, S. 193–213. DOI: 10.1146/annurev.physiol.63.1.193.

Stocco, Douglas M.; Wang, XingJia; Jo, Youngah; Manna, Pulak R. (2005): Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 19 (11), S. 2647–2659. DOI: 10.1210/me.2004-0532.

Stowasser, M.; Gordon, R. D.; Tunny, T. J.; Klemm, S. A.; Finn, W. L.; Krek, A. L. (1992): Familial hyperaldosteronism type II: five families with a new variety of primary aldosteronism. In: *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 19 (5), S. 319–322. DOI: 10.1111/j.1440-1681.1992.tb00462.x.

Sugimoto, Mayumi; Sasaki, Shinji; Gotoh, Yusaku; Nakamura, Yuuki; Aoyagi, Yoshito; Kawahara, Takayoshi; Sugimoto, Yoshikazu (2013): Genetic variants related to gap junctions and hormone secretion influence conception rates in cows. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (48), S. 19495–19500. DOI: 10.1073/pnas.1309307110.

Summa, V.; Mordasini, D.; Roger, F.; Bens, M.; Martin, P. Y.; Vandewalle, A. et al. (2001): Short term effect of aldosterone on Na,K-ATPase cell surface expression in kidney collecting duct cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (50), S. 47087–47093. DOI: 10.1074/jbc.M107165200.

Sun, Yao; Zhang, Jiakun; Lu, Li; Chen, Sue S.; Quinn, Mark T.; Weber, Karl T. (2002): Aldosterone-Induced Inflammation in the Rat Heart. In: *The American journal of pathology* 161 (5), S. 1773–1781. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64454-9.

Sutherland, D. J.; Ruse, J. L.; Laidlaw, J. C. (1966): Hypertension, increased aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone. In: *Canadian Medical Association journal* 95 (22), S. 1109–1119.

Taguchi, Ryo; Yamada, Masanobu; Nakajima, Yasuyo; Satoh, Tetsurou; Hashimoto, Koshi; Shibusawa, Nobuyuki et al. (2012): Expression and mutations of KCNJ5 mRNA in Japanese patients with aldosterone-producing adenomas. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97 (4), S. 1311–1319. DOI: 10.1210/jc.2011-2885.

Takeda, Y.; Miyamori, I.; Inaba, S.; Furukawa, K.; Hatakeyama, H.; Yoneda, T. et al. (1997): Vascular aldosterone in genetically hypertensive rats. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 29 (1 Pt 1), S. 45–48. DOI: 10.1161/01.hyp.29.1.45.

Takemori, Shigeki; Kominami, Shiro (1984): The role of cytochromes P-450 in adrenal steroidogenesis. In: *Trends in Biochemical Sciences* 9 (9), S. 393–396. DOI: 10.1016/0968-0004(84)90223-8.

Talavera, K.; Staes, M.; Janssens, A.; Klugbauer, N.; Droogmans, G.; Hofmann, F.; Nilius, B. (2001): Aspartate residues of the Glu-Glu-Asp-Asp (EEDD) pore locus control selectivity and permeation of the T-type Ca(2+) channel alpha(1G). In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (49), S. 45628–45635. DOI: 10.1074/jbc.M103047200.

Tang, Lin; Gamal El-Din, Tamer M.; Payandeh, Jian; Martinez, Gilbert Q.; Heard, Teresa M.; Scheuer, Todd et al. (2014): Structural basis for Ca2+ selectivity of a voltage-gated calcium channel. In: *Nature* 505 (7481), S. 56–61. DOI: 10.1038/nature12775.

Tauber, P.; Penton, D.; Stindl, J.; Humberg, E.; Tegtmeier, I.; Sterner, C. et al. (2014): Pharmacology and pathophysiology of mutated KCNJ5 found in adrenal aldosterone-producing adenomas. In: *Endocrinology* 155 (4), S. 1353–1362. DOI: 10.1210/en.2013-1944.

Tauber, Philipp; Aichinger, B.; Christ, C.; Stindl, J.; Rhayem, Y.; Beuschlein, F. et al. (2016): Cellular Pathophysiology of an Adrenal Adenoma-Associated Mutant of the Plasma Membrane Ca(2+)-ATPase ATP2B3. In: *Endocrinology* 157 (6), S. 2489–2499. DOI: 10.1210/en.2015-2029.

Temel, R. E.; Trigatti, B.; DeMattos, R. B.; Azhar, S.; Krieger, M.; Williams, D. L. (1997): Scavenger receptor class B, type I (SR-BI) is the major route for the delivery of high density lipoprotein cholesterol to the steroidogenic pathway in cultured mouse adrenocortical cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (25), S. 13600–13605. DOI: 10.1073/pnas.94.25.13600.

Thomas, Roger C. (2009): The plasma membrane calcium ATPase (PMCA) of neurones is electroneutral and exchanges 2 H+ for each Ca2+ or Ba2+ ion extruded. In: *The Journal of physiology* 587 (2), S. 315–327. DOI: 10.1113/jphysiol.2008.162453.

Thomas, Warren; Harvey, Brian J. (2011): Mechanisms underlying rapid aldosterone effects in the kidney. In: *Annual review of physiology* 73, S. 335–357. DOI: 10.1146/annurev-physiol-012110-142222.

Tombaugh, G. C.; Somjen, G. G. (1997): Differential sensitivity to intracellular pH among high- and low-threshold Ca2+ currents in isolated rat CA1 neurons. In: *Journal of neurophysiology* 77 (2), S. 639–653. DOI: 10.1152/jn.1997.77.2.639.

Tong, Anli; Liu, Guanghua; Wang, Fen; Jiang, Jun; Yan, Zhaoli; Zhang, Dianxi et al. (2016): A Novel Phenotype of Familial Hyperaldosteronism Type III: Concurrence of Aldosteronism and Cushing's Syndrome. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 101 (11), S. 4290–4297. DOI: 10.1210/jc.2016-1504.

Tottene, Angelita; Fellin, Tommaso; Pagnutti, Stefano; Luvisetto, Siro; Striessnig, Joerg; Fletcher, Colin; Pietrobon, Daniela (2002): Familial hemiplegic migraine mutations increase Ca(2+) influx through single human CaV2.1 channels and decrease maximal CaV2.1 current density in neurons. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (20), S. 13284–13289. DOI: 10.1073/pnas.192242399.

Trapp, T.; Holsboer, F. (1995): Ligand-induced conformational changes in the mineralocorticoid receptor analyzed by protease mapping. In: *Biochemical and biophysical research communications* 215 (1), S. 286–291. DOI: 10.1006/bbrc.1995.2464.

Tseng, G. N.; Boyden, P. A. (1991): Different effects of intracellular Ca and protein kinase C on cardiac T and L Ca currents. In: *The American journal of physiology* 261 (2 Pt 2), H364-79. DOI: 10.1152/ajpheart.1991.261.2.H364.

Tytgat, J.; Nilius, B.; Carmeliet, E. (1990): Modulation of the T-type cardiac Ca channel by changes in proton concentration. In: *The Journal of general physiology* 96 (5), S. 973–990. DOI: 10.1085/jgp.96.5.973.

Usher, Michael G.; Duan, Sheng Zhong; Ivaschenko, Christine Y.; Frieler, Ryan A.; Berger, Stefan; Schütz, Günther et al. (2010): Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 120 (9), S. 3350–3364. DOI: 10.1172/JCI41080.

Várnai, P.; Petheö, G. L.; Makara, J. K.; Spät, A. (1998): Electrophysiological study on the high K+ sensitivity of rat glomerulosa cells. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 435 (3), S. 429–431. DOI: 10.1007/s004240050534.

Vergara, Cecilia; Latorre, Ramon; Marrion, Neil V.; Adelman, John P. (1998): Calcium-activated potassium channels. In: *Current Opinion in Neurobiology* 8 (3), S. 321–329. DOI: 10.1016/S0959-4388(98)80056-1.

Vitko, Iuliia; Chen, Yucai; Arias, Juan M.; Shen, Yen; Wu, Xi-Ru; Perez-Reyes, Edward (2005): Functional characterization and neuronal modeling of the effects of childhood absence epilepsy variants of CACNA1H, a T-type calcium channel. In: *J. Neurosci.* 25 (19), S. 4844–4855. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0847-05.2005.

Vleugels, K.; Schinner, S.; Krause, D.; Morawietz, H.; Bornstein, S. R.; Ehrhart-Bornstein, M.; Krug, A. W. (2011): ERK1/2 MAPKs and Wnt signaling pathways are independently involved in adipocytokine-mediated aldosterone secretion. In: *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 119 (10), S. 644–648. DOI: 10.1055/s-0031-1284367.

Wada, A.; Ohnishi, T.; Nonaka, Y.; Okamoto, M.; Yamano, T. (1985): Synthesis of aldosterone by a reconstituted system of cytochrome P-45011 beta from bovine adrenocortical mitochondria. In: *Journal of biochemistry* 98 (1), S. 245–256. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135264.

Wang, Qiming J. (2006): PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. In: *Trends in pharmacological sciences* 27 (6), S. 317–323. DOI: 10.1016/j.tips.2006.04.003.

Wendel, Angela A.; Lewin, Tal M.; Coleman, Rosalind A. (2009): Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1791 (6), S. 501–506. DOI: 10.1016/j.bbalip.2008.10.010.

White, Katharine A.; Grillo-Hill, Bree K.; Esquivel, Mario; Peralta, Jobelle; Bui, Vivian N.; Chire, Ismahan; Barber, Diane L. (2018): β-Catenin is a pH sensor with decreased stability at higher intracellular pH. In: *The Journal of cell biology* 217 (11), S. 3965–3976. DOI: 10.1083/jcb.201712041.

White, P. C.; Mune, T.; Agarwal, A. K. (1997): 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. In: *Endocrine reviews* 18 (1), S. 135–156. DOI: 10.1210/edrv.18.1.0288.

Wiederkehr, Andreas; Szanda, Gergo; Akhmedov, Dmitry; Mataki, Chikage; Heizmann, Claus W.; Schoonjans, Kristina et al. (2011): Mitochondrial matrix calcium is an activating signal for hormone secretion. In: *Cell metabolism* 13 (5), S. 601–611. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.03.015.

Wikiera, Beata; Jakubiak, Aleksandra; Zimowski, Janusz; Noczyńska, Anna; Smigiel, Robert (2012): Complex glycerol kinase deficiency - X-linked contiguous gene syndrome involving congenital adrenal hypoplasia, glycerol kinase deficiency, muscular Duchenne dystrophy and intellectual disability (IL1RAPL gene deletion). In: *Pediatric endocrinology, diabetes, and metabolism* 18 (4), S. 153–157.

Wilke, Bettina U.; Lindner, Moritz; Greifenberg, Lea; Albus, Alexandra; Kronimus, Yannick; Bünemann, Moritz et al. (2014): Diacylglycerol mediates regulation of TASK potassium channels by Gq-coupled receptors. In: *Nature communications* 5, S. 5540. DOI: 10.1038/ncomms6540.

Williams, Bryan; Mancia, Giuseppe; Spiering, Wilko; Agabiti Rosei, Enrico; Azizi, Michel; Burnier, Michel et al. (2018): 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. In: *European heart journal* 39 (33), S. 3021–3104. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy339.

Williams, M. E.; Washburn, M. S.; Hans, M.; Urrutia, A.; Brust, P. F.; Prodanovich, P. et al. (1999): Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel. In: *Journal of neurochemistry* 72 (2), S. 791–799. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1999.0720791.x.

Wu, Vin-Cent; Wang, Shuo-Meng; Chueh, Shih-Chieh Jeff; Yang, Shao-Yu; Huang, Kuo-How; Lin, Yen-Hung et al. (2017): The prevalence of CTNNB1 mutations in primary aldosteronism and consequences for clinical outcomes. In: *Scientific reports* 7, S. 39121. DOI: 10.1038/srep39121.

Yoo, Dana; Kim, Bo Young; Campo, Cristina; Nance, Latreece; King, Amanda; Maouyo, Djikolngar; Welling, Paul A. (2003): Cell surface expression of the ROMK (Kir 1.1) channel is regulated by the aldosterone-induced kinase, SGK-1, and protein kinase A. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (25), S. 23066–23075. DOI: 10.1074/jbc.M212301200.

Yoshida, Y.; Imai, S. (1997): Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. In: *Japanese journal of pharmacology* 74 (2), S. 125–137. DOI: 10.1254/jjp.74.125.

Young, Leonie S.; Murphy, Geraldine; Kelly, Sinead N.; Smith, Thomas P.; Cunningham, Sean K.; Joseph McKenna, T. (2003): Differential production of adrenal steroids by purified cells of the human adrenal cortex is relative rather than absolute. In: *European journal of endocrinology* 148 (1), S. 139–145. DOI: 10.1530/eje.0.1480139.

Young, Morag J. (2008): Mechanisms of mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis and vascular inflammation. In: *Current opinion in nephrology and hypertension* 17 (2), S. 174–180. DOI: 10.1097/MNH.0b013e3282f56854.

Zhao, Yanyu; Huang, Gaoxingyu; Wu, Qiurong; Wu, Kun; Li, Ruiqi; Lei, Jianlin et al. (2019): Cryo-EM structures of apo and antagonist-bound human Cav3.1. In: *Nature* 576 (7787), S. 492–497. DOI: 10.1038/s41586-019-1801-3.

6 Anhang

6.1 Plasmidkarten

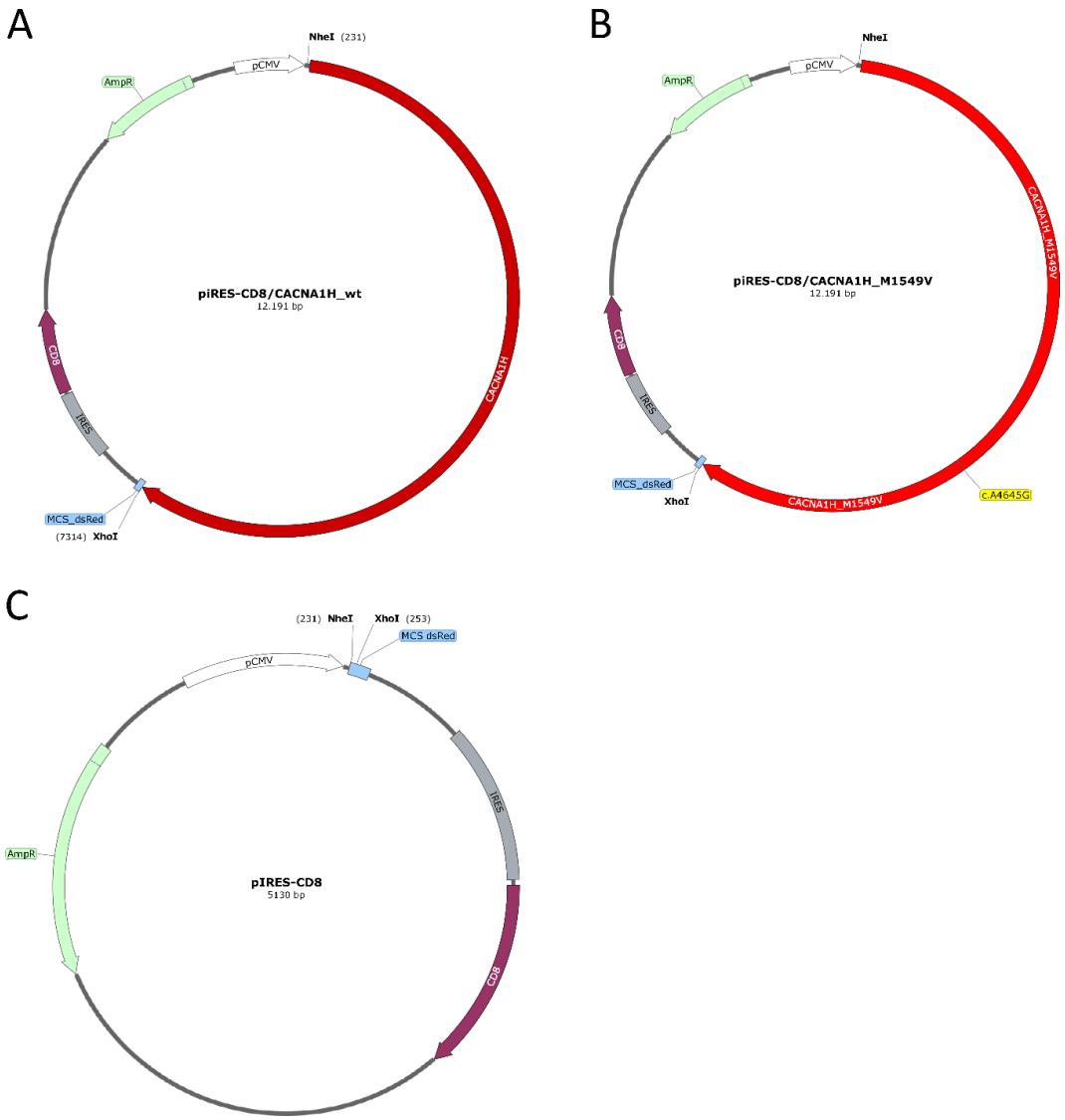
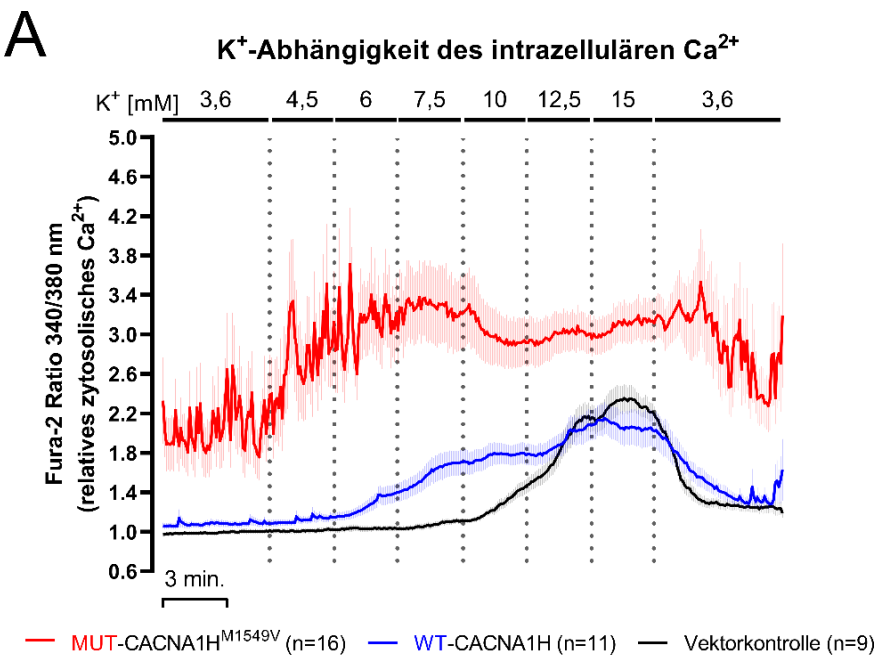


Abbildung 27: ***Plasmidkarten von pIRES-CD8/CACNA1H^{WT} (A), pIRES-CD8/CACNA1H^{M1549V} (B) und pIRES-CD8 (C)***

6.2 Calciummessungen bei 37°C

Wie unter 3.1.9 beschrieben, wurden die Ca^{2+}-Messungen bei 37°C bereits in Vorversuchen durchgeführt und sind in der Bachelorarbeit von Katrin Imminger beschrieben (Imminger 2016). Zum besseren Verständnis der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse, zeigt die folgende Abbildung 28 die Calcium-Messungen bei 37°C, basierend auf den unter Imminger (2016) beschriebenen Versuchen.



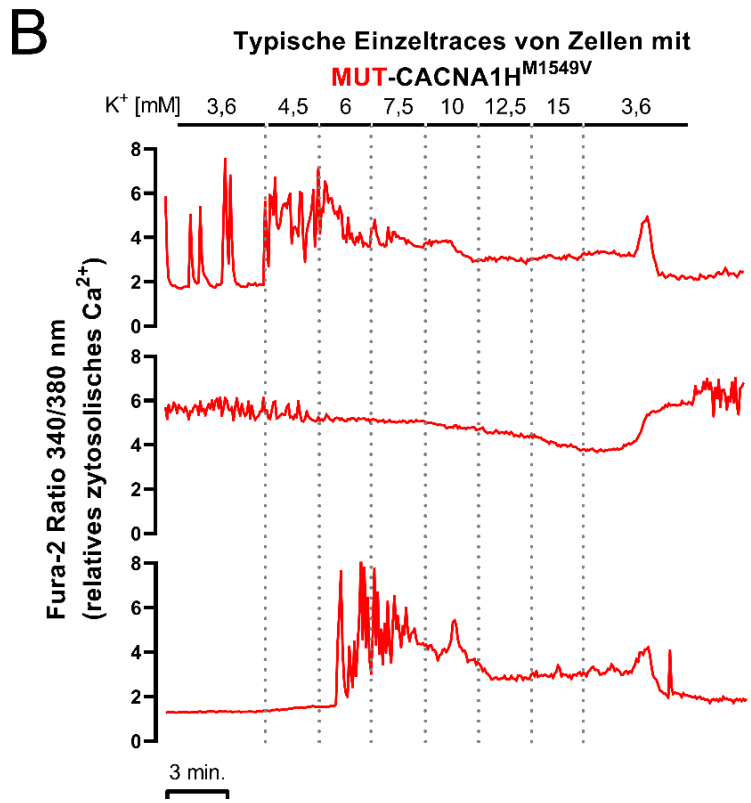


Abbildung 28: ***Einfluss der extrazellulären K⁺-Konzentration auf die Ca²⁺-Aktivität in NCI-Zellen, transfiziert mit CACNA1H^{M1549V} (rot), CACNA1H^{WT} (blau) oder Kontrollvektor (weiß).*** *(A) Die Abbildung zeigt den Mittelwert ±SEM der Ratios der Fura-2-Fluoreszenzintensitäten nach Anregung bei 340 und 380 nm als Maß für cytosolisches Ca²⁺, gemessen bei 37°C.* ***(B)*** *Gezeigt sind repräsentative Einzelmessungen. Die gezeigten Daten beruhen auf Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe und wurden bereits in der Bachelorarbeit von Katrin Imminger veröffentlicht (Imminger 2016).*

6.3 Übersicht über die bei der Proteomanalyse erhaltenen potentiellen Kandidaten

Gene names (primary)	Ctrl	NaCl	NaAc	K+	K+/NaCl	K+/NaAc	AngII	AngI/NaCl	AngII/NaAc	T-Test Ang-Ang/NaAc
ZNF326	1,00	2,60	3,25	4,59	4,23	6,30	3,75	4,11	5,99	0,010
MT-ATP8	1,00	3,07	3,36	3,36	4,33	3,99	2,38	1,10	3,58	0,014
PUDP	1,00	1,93	1,67	2,95	2,17	3,07	2,11	3,50	3,17	0,055
GLRX	1,00	1,66	2,39	3,07	3,01	2,52	1,22	2,75	3,06	0,106
FAM20B	1,00	7,98	5,96	6,32	8,23	1,65	3,86	1,64	3,03	0,069
STAR	1,00	0,84	1,10	1,67	1,72	1,97	1,49	1,47	2,26	0,005
PTRHD1	1,00	1,38	1,88	1,53	1,21	1,69	1,43	0,77	2,09	0,038
MOSPD2	1,00	1,90	2,20	2,12	1,85	1,51	0,92	1,79	2,05	0,007
CYP11B2	1,00	0,83	1,13	1,87	1,76	2,13	1,42	1,32	2,04	0,092
MED15	1,00	1,15	1,12	1,36	1,05	1,05	0,75	1,08	1,87	0,017
GOLM2	1,00	1,45	1,54	1,63	1,45	1,78	1,34	1,43	1,84	0,005
PAM	1,00	1,65	1,09	1,66	1,53	1,53	2,29	2,02	1,82	0,000
CTTNBP2NL	1,00	1,44	1,14	1,37	1,75	1,50	0,90	1,14	1,68	0,072
HMGN1	1,00	1,58	1,21	1,46	2,14	2,03	1,77	1,58	1,62	0,140
FXN	1,00	1,36	0,80	0,93	1,17	1,31	0,95	0,95	1,60	0,036
CYP21A2	1,00	1,02	1,13	1,24	1,18	1,26	1,32	1,36	1,56	0,017
ENDOD1	1,00	1,06	1,04	1,02	1,05	1,13	1,17	1,25	1,51	0,070
YBX3	1,00	1,03	0,91	1,05	0,78	1,23	0,93	1,18	1,51	0,023
APOO	1,00	1,30	1,33	1,08	1,25	1,50	0,99	1,03	1,50	0,125
COX6C	1,00	1,26	1,36	1,37	1,36	1,36	1,09	1,34	1,49	0,061
COX6A1	1,00	1,30	1,11	1,26	1,42	1,33	1,23	1,37	1,49	0,129
PFDN1	1,00	1,11	1,30	1,25	1,27	1,26	1,14	1,32	1,46	0,062
PSMB6	1,00	1,53	1,47	1,54	1,82	1,56	1,82	1,81	1,45	0,040
HS1BP3	1,00	1,26	1,21	1,17	1,33	0,71	0,73	1,50	1,42	0,117
F11R	1,00	1,15	1,20	1,06	1,13	1,38	1,14	1,09	1,42	0,075
MRPL12	1,00	1,19	1,36	1,17	1,31	1,24	1,10	1,23	1,40	0,009
DHRS7B	1,00	1,34	1,22	1,44	1,21	1,22	1,08	1,03	1,39	0,106
ITGA7	1,00	1,00	1,00	1,06	1,10	1,22	1,25	1,29	1,38	0,059
NRM	1,00	1,46	1,62	1,10	1,70	1,53	0,98	1,40	1,37	0,049
GK	1,00	0,99	1,27	0,93	1,19	1,09	1,00	0,97	1,37	0,041
GOPC	1,00	1,20	1,17	1,15	1,09	1,32	1,15	1,12	1,36	0,038
ATP5ME	1,00	1,19	1,08	1,23	1,32	1,12	1,12	1,17	1,36	0,104
UBXN1	1,00	1,02	1,19	1,19	1,19	1,23	0,85	1,07	1,36	0,101
QTRT2	1,00	0,81	1,07	0,86	0,93	0,75	1,09	0,74	0,75	0,137
SLC38A2	1,00	0,72	0,98	0,97	1,30	1,50	1,32	1,53	0,74	0,103
CDK1	1,00	1,05	0,81	0,98	0,94	0,84	0,85	0,86	0,74	0,142
DHX40	1,00	0,98	0,98	0,89	1,15	1,12	1,01	1,09	0,73	0,080
EXOSC8	1,00	1,10	0,76	1,00	1,01	0,84	0,93	0,69	0,73	0,059
DDX27	1,00	1,15	0,86	0,72	0,68	0,67	1,04	0,81	0,73	0,004
BTD	1,00	1,45	0,96	1,35	1,24	0,95	1,37	1,42	0,72	0,008
POP7	1,00	0,73	0,76	0,77	0,93	0,77	0,83	0,94	0,72	0,114
SMC4	1,00	0,99	0,75	0,94	0,87	0,73	0,90	0,87	0,72	0,015
NCAPG	1,00	1,15	1,14	0,92	1,01	0,88	1,07	1,14	0,72	0,035
POLD1	1,00	1,01	0,87	1,06	1,03	0,77	0,90	0,94	0,72	0,075
CHAF1B	1,00	0,99	0,89	0,88	0,80	0,84	0,94	0,82	0,72	0,029
MYO6	1,00	0,95	0,91	1,05	1,03	1,02	0,88	0,98	0,71	0,024
IPO8	1,00	0,90	0,80	0,88	0,85	0,75	0,81	0,77	0,71	0,010
GEMIN5	1,00	0,95	0,65	0,74	0,83	0,81	1,00	0,87	0,70	0,020
RBPJ	1,00	1,14	0,92	1,15	0,98	0,80	1,12	1,27	0,70	0,057
CIP2A	1,00	0,88	0,85	0,78	0,81	0,74	0,82	0,90	0,70	0,144
KCNJ5	1,00	1,29	1,04	1,32	1,08	1,24	1,38	1,55	0,70	0,003
CDC16	1,00	0,97	0,87	0,83	0,77	0,71	0,79	0,85	0,70	0,005
KIF23	1,00	0,96	0,70	0,84	0,83	0,69	0,83	0,81	0,69	0,127
RPTOR	1,00	0,83	1,14	1,01	0,87	0,88	0,92	1,00	0,69	0,073
FANCI	1,00	0,90	0,86	0,85	0,95	0,83	0,87	0,81	0,68	0,094
KAT7	1,00	0,88	0,76	0,93	0,90	0,73	0,85	0,83	0,67	0,149
XAB2	1,00	1,02	0,79	0,96	0,88	0,77	0,88	0,93	0,65	0,058
SMC2	1,00	0,95	0,80	0,91	0,89	0,74	0,84	0,83	0,65	0,048
PODXL2	1,00	0,91	0,51	1,96	1,32	0,99	2,74	1,96	0,64	0,044
RRM2	1,00	0,98	0,72	0,80	0,84	0,72	0,87	0,77	0,63	0,021
NCK2	1,00	0,99	0,72	0,94	1,07	0,76	1,09	0,84	0,60	0,014
KRR1	1,00	0,94	1,07	1,01	0,73	0,49	1,33	1,29	0,60	0,025
TTI1	1,00	0,57	0,79	0,81	0,59	0,63	0,76	0,71	0,60	0,093
ATAD2	1,00	0,97	0,83	0,90	0,78	0,76	0,82	0,86	0,59	0,002
PRC1	1,00	1,17	0,78	1,07	0,85	0,60	0,86	0,87	0,59	0,075
SLC1A3	1,00	1,05	0,92	0,87	0,85	0,71	0,94	1,02	0,59	0,002
SQSTM1	1,00	0,99	0,71	0,91	0,82	0,68	0,92	0,89	0,55	0,011
TK1	1,00	1,07	0,77	0,84	0,83	0,71	0,75	0,76	0,54	0,047
PRRC2A	1,00	0,96	1,12	1,12	1,17	1,17	1,16	0,79	0,52	0,056
CDAN1	1,00	0,89	0,85	0,75	0,45	0,45	1,01	0,73	0,50	0,030
TTK	1,00	0,93	0,57	0,72	0,80	0,71	0,90	0,61	0,34	0,014

Abbildung 29: ***Übersicht über die bei der Proteomanalyse erhaltenen potentiellen Kandidaten.*** *Da nur wenige Proteine reguliert waren, wenn das übliche Signifikanzniveau und eine ausreichend starke Regulation vorausgesetzt wurden, wurden für die Auswahl der Kandidaten weniger strenge Kriterien angewendet. Dadurch blieben die hier gezeigten 71 Proteine übrig, von denen 33 eine erhöhte und 38 eine erniedrigte Expression unter Ang II + NaAc zeigen. Die drei an der Steroidhormonbiosynthese beteiligten Enzyme sind blau, die durch Literaturrecherche ausgewählten Kandidaten grün markiert.*

6.4 Publikationen

Gürtler, Florian*; Jordan, Katrin*; Tegtmeier, Ines; Herold, Janina; Stindl, Julia; Warth, Richard; Bandulik, Sascha (2020):

Cellular Pathophysiology of Mutant Voltage-Dependent Ca2+ Channel CACNA1H in Primary Aldosteronism.

Endocrinology 161 (10). DOI: 10.1210/endocr/bqaa135.

6.5 Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

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

Regensburg, 24.09.2021 _____

Florian Gürtler

7 Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während der Zeit meiner Doktorarbeit begleitet, unterstützt und motiviert haben.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater PD Dr. Sascha Bandulik für die Überlassung des Themas sowie die umfassende Betreuung und wissenschaftliche Beratung während der vergangenen drei Jahre. Er schaffte es immer wieder, mich neu zu begeistern und zu motivieren. Besonders hervorheben möchte ich seine freundliche Art sowie sein stetes Interesse an den Ergebnissen meiner Experimente.

Weiterhin gilt ein großer Dank auch Prof. Dr. Richard Warth, der mich von Anfang an freundlich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen. Außerdem möchte ich ihm dafür danken, dass er mir als ausgezeichneter Mentor zur Seite stand und immer hilfreiche Tipps und Ratschläge hatte, wenn ich an einem Punkt nicht weitergekommen bin.

Auch meinem zweiten Mentor, Prof. Dr. Dr. Vladimir Todorov (Universitätsklinikum Dresden), möchte ich dafür danken, dass er mich jederzeit mit Ratschlägen unterstützt hat, wenn ich Fragen an ihn hatte.

Des Weiteren gilt mein Dank auch Ines Tegtmeier für ihre Unterstützung bei den kleinen Problemen des Alltags, ihre Hilfe bei allen Fragen zur Zellkultur sowie die Durchführung einzelner qPCR-Läufe. Ebenfalls danken möchte ich Christina Sterner für ihre permanente Hilfsbereitschaft. Ebenso gilt mein Dank Katrin Jordan, die mich am Beginn meiner Doktorarbeit in die Methoden der Calcium- und pH-Messung sowie Zellkultur eingeführt hat. Dr. Katharina Limm (Institut für funktionelle Genomik) danke ich für die Durchführung der Proteomanalyse.

Darüber hinaus möchte ich allen Arbeitskollegen am Lehrstuhl Medizinische Zellbiologie für die gegenseitige Unterstützung und die allzeit gute Atmosphäre im Labor danken. Hervorheben dabei möchte ich Allen Plain. Er war immer gerne bereit, beim gemeinsamen Mittagessen oder nachmittags bei einer Tasse Kaffee über allgemeine Dinge zu plaudern, aber auch Probleme und Ideen zu unseren Experimenten zu erörtern. Auch Laura Knödl möchte ich erwähnen, die uns während ihrer Zeit im Labor bei diesen „Auszeiten“ immer gute Gesellschaft geleistet hat.

Dank geht auch an RIGeL für das großes Angebot an Veranstaltungen und Kursen. Außerdem war das RIGeL-Team immer zur Stelle, wenn es organisatorische Fragen gab.

Zuletzt möchte ich mich herzlich bei meiner Familie und besonders meiner Freundin Juli bedanken, die mich bereits während des Studiums, aber auch besonders während meiner Promotion immer unterstützt haben. Gerade in den teils stressigen Phasen während des Schreibens der Doktorarbeit konnte ich mich stets auf ihre Unterstützung und ihr Verständnis verlassen.