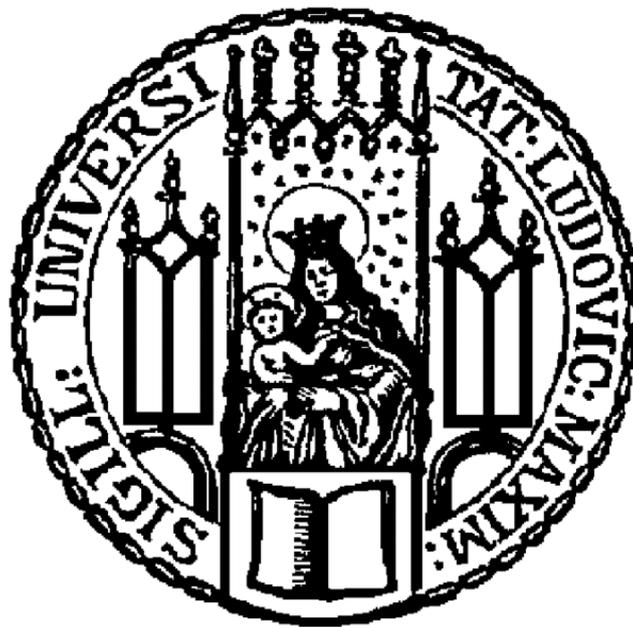


Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Schwerpunkt Endokrinologische Forschung, Leiter: Prof. Dr. med. F. Beuschlein

Phänotypische Charakterisierung transgener Mauslinien mit
nebenierenspezifischer Expression von KCNJ5



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Philipp Lorenz Schmid
aus München

Jahr
2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität

Berichterstatter: Prof. Dr. med. F. Beuschlein

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Martin Hrabě de Angelis
Prof. Dr. Stefan R. Bornstein

Mitbetreuung durch: PD Dr. med. habil. Dr. nat. med. U. Lichtenauer

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2022

1. Einleitung	6
1.1 Die Nebenniere – Grundlagen	6
1.1.1 Aufbau und Funktion.....	6
1.1.2 Steroidbiosynthese	7
1.1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	8
1.2 Arterielle Hypertonie	11
1.2.1 Epidemiologie	11
1.2.2 Definition der arteriellen Hypertonie	11
1.2.3 Folgen und Komplikationen der arteriellen Hypertonie.....	12
1.2.4 Ursachen der arteriellen Hypertonie	13
1.3 Primärer Hyperaldosteronismus/Conn-Syndrom.....	15
1.3.1 Prävalenz und Geschichte des Primären Hyperaldosteronismus..	15
1.3.2 Klinik	15
1.3.3 Diagnostik.....	16
1.3.4 Therapie.....	17
1.3.5 Molekulare Ursachen des primären Hyperaldosteronismus	17
1.3.5.1 KCNJ5-Gen.....	17
1.3.5.2 ATP1A1/ATP2B3-Gen	21
1.3.5.3 CACNA1D-Gen	22
1.4 Zielsetzung dieser Dissertationsarbeit	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Geräte und Zubehör	24
2.2 Chemikalien und Kits.....	25
2.3 Puffer, Lösungen und Gele	26
2.4 Versuchstiere.....	26
2.4.1 Generierung der transgenen Tiere	26
2.4.2 Genotypisierung der Tiere	29
2.5 Versuchsaufbau	31
2.6 Basale Phänotypisierung	31
2.7 Funktionelle Testung	32

2.8 Versuchsdurchführung	32
2.8.1 Blut und Organentnahme.....	32
2.8.2 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese	33
2.8.3 Real-time PCR.....	33
2.8.4 Aldosteronbestimmung.....	34
2.8.5 Morphologische Untersuchungen.....	34
2.8.6 Immunhistochemie.....	35
2.8.7 Statistische Auswertung	36
3. Ergebnisse	37
3.1 Adrenale KCNJ5 Expression	37
3.2 Maus – und Organgewichte	38
3.3 Morphologie und Zonierung der Nebenniere	45
3.4 Expression von Enzymen der Steroidbiosynthese	48
3.4.1 Basaler Phänotyp nach 8 Wochen	48
3.4.2 Basaler Phänotyp nach 40 Wochen	50
3.4.3 Kochsalzbelastungs-Test.....	53
3.4.4 ACTH Stimations-Test	55
3.5 Plasmaaldosteronkonzentration	58
4. Diskussion und Einordnung der Ergebnisse	59
4.1 Adrenale KCNJ5 Expression	59
4.2 Körper – und Organgewichte	60
4.3 Expression von Enzymen der Steroidbiosynthese	62
4.3.1 Basaler Phänotyp nach 8 Wochen und nach 40 Wochen	62
4.3.2 Kochsalzbelastungstest	64
4.3.3 ACTH-Stimulationstest	65
4.4 Plasmaaldosteronkonzentration	66
4.5 Ausblick	67
5 Zusammenfassung	69
Selbstständigkeitserklärung	76
Danksagung	77

Curriculum Vitae.....78

1. Einleitung

1.1 Die Nebenniere – Grundlagen

1.1.1 Aufbau und Funktion

Die murinen Nebennieren, *Glandulae suprarenales*, sind paarige Organe die von einer Fettgewebshülle, der *Capsula adiposa renalis* umgeben werden und jeweils dem oberen Nierenpol aufsitzen. Sie haben eine retroperitoneale Lage und wiegen ca. 3 mg, wobei die der Weibchen etwas größer und schwerer sind als die der Männchen (1). Funktionell und entwicklungsgeschichtlich bestehen die Nebennieren aus zwei verschiedenen Teilen (2): dem aus dem Neuroektoderm stammenden Nebennierenmark (Medulla) und der mesodermalen Nebennierenrinde (Cortex). Das Mark besteht aus chromaffinen Zellen, die Katecholamine produzieren und von zahlreichen Sinuskapillaren umgeben sind. Grob lassen sich diese Zellen in zwei Typen einteilen: Typ 1- oder A-Zellen, die chromaffine Granula besitzen, welche Adrenalin enthalten; sowie Typ 2- oder N-Zellen, deren Granula mit Noradrenalin gefüllt sind. Die Nebennierenrinde setzt sich aus drei Zonen zusammen. Von außen nach innen ist sie unterteilt in: die Zona glomerulosa, Zona fasciculata und – beim Menschen – die Zona reticularis. Wie bereits der Name vermuten lässt zeichnet sich die Zona glomerulosa histologisch durch knäuelartig angeordnete Zellnestern aus ovoiden, azidophilen Zellen aus (3). Sie unterliegt der Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und ist für die Produktion von Mineralkortikoiden zuständig. Die mittlere Schicht – die größte der Zonen – ist die Zona fascicularis. Die Zellen der Zona fasciculata sind strangartig angeordnet und von großer polygonaler Struktur. Hier werden insbesondere Glukokortikoide produziert. Das wichtigste Glukokortikoid bei Nagern ist Corticosteron. Da den Nebennieren der Nagern das Enzym 17-Hydroxylase fehlt, sind sie nicht wie Menschen in der Lage, adrenale Androgene und Cortisol zu bilden (4). Gemeinsames histologisches Merkmal der Zellen der Nebennierenrinde sind zahlreiche Lipidtröpfchen zur Speicherung der Cholesterinester als Ausgangsstoff der Steroidsynthese, sowie zahlreiche tubuläre Mitochondrien und ein ausgeprägtes glattes endoplasmatisches Retikulum als typisches Merkmal Steroidhormon- produzierender Zellen (5; 6). Beide Zonen werden unter anderem durch ACTH stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Stimulation sowohl zu einer Hypertrophie, als auch einer Hyperplasie der Nebennieren führt (1). Die Nebenniere der

Maus besitzt im Gegensatz zur Nebenniere des Menschen keine Zona reticularis. Hier findet sich die sogenannte X-Zone. Sie entwickelt sich wenige Tage nach Geburt bei beiden Geschlechtern und ist zum Zeitpunkt der Entwöhnung voll ausgebildet. Zur Rückbildung der X-Zone kommt es bei Männchen nach ca. 5 Wochen – dem Ende der Pubertät. Die der Weibchen bleibt einige Wochen länger bestehen und bildet sich nach der ersten Schwangerschaft ebenfalls weitgehend zurück. Bei Nullipara kann sie etwas länger bestehen. Die genaue Funktion dieses Bereichs der Nebenniere ist aktuell unklar. Entwicklung und Rückbildung scheinen durch Sexual- und Schilddrüsenhormone beeinflusst zu werden. Beispielsweise kann eine Gonadektomie bei präpubertären Mäusen dazu führen, dass die X-Zone länger bestehen bleibt. Bei postpubertären Männchen kann sich nach Kastration eine solche Zone neu bilden. Testosteron führt bei Weibchen zu einer Involution der X-Zone (1; 7; 8).

1.1.2 Steroidbiosynthese

Das Ausgangsprodukt der Steroidhormone ist Cholesterin. Hauptquellen sind die direkte Nahrungsaufnahme und eine De-novo-Synthese aus Acetyl-Coenzym A (aktivierte Essigsäure) durch die Leber. Der Transport im Blut erfolgt über very-low-density-Lipoproteine (VLDL) oder low-density-Lipoproteine (LDL) zu extrahepatischen Geweben. Dort werden die Lipoproteine nach Bindung an spezifische LDL-Rezeptoren via Endozytose aufgenommen und Cholesterin freigesetzt (9). Bildungsort der Steroidhormone ist die Nebennierenrinde. Auf Grund des Unvermögens, größere Mengen an lipophilen Hormonen speichern zu können, ist eine akute Sekretion von einer schnellen Biosynthese abhängig. Geschwindkeitsbestimmend dabei ist die Translokation von Cholesterin von der äußeren zur inneren Membran der Mitochondrien durch das Steroid acute regulatory Protein (StAR) (10). Unter anderem steigert ACTH die StAR Expression über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Im Inneren der Mitochondrien wird die Alkylseitenkette des Cholesterins mit Hilfe der Cholesterin-Desmolase (Cytochrom P450 Side Chain Cleavage Enzyme, P450SCC) um 6 C-Atome verkürzt und eine Keto-Gruppe eingeführt, sodass Pregenolon entsteht. Im Anschluss erfolgen drei Hydroxylierungen durch Cytochrom-P₄₅₀-Monooxygenasen. Pregenolon wird nach Verlassen des Mitochondriums am glatten endoplasmatischen Retikulum zunächst durch die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β HSD) in Progesteron umgewandelt, dieses wiederum durch die 21-Hydroxylase (CYP21) in 11-Desoxycorticosteron. Erneut innerhalb der Mitochondrien wird durch die dritte

Hydroxylierung via 11 β -Hydroxylase (Cyp11b1) 11-Desoxycorticosteron in Corticosteron überführt, dem Hauptprodukt der murinen Zona fasciculata. Katalysiert durch die Aldosteronsynthase (Cyp11b2) entsteht letztendlich als Hauptprodukt der Zona glomerulosa aus Corticosteron über 18-Hydroxycorticosteron Aldosteron (9; 10). Wichtig zu erwähnen ist, dass Mäuse im Gegensatz zu Menschen keine 17-Hydroxylase (Cyp17) besitzen. Aus diesem Grund sind sie nicht in der Lage, Cortisol zu synthetisieren. Als Glukokortikoid bilden sie Corticosteron, das Zwischenprodukt der Aldosteronsynthese (schematische Zusammenfassung in Abbildung 1) (4).

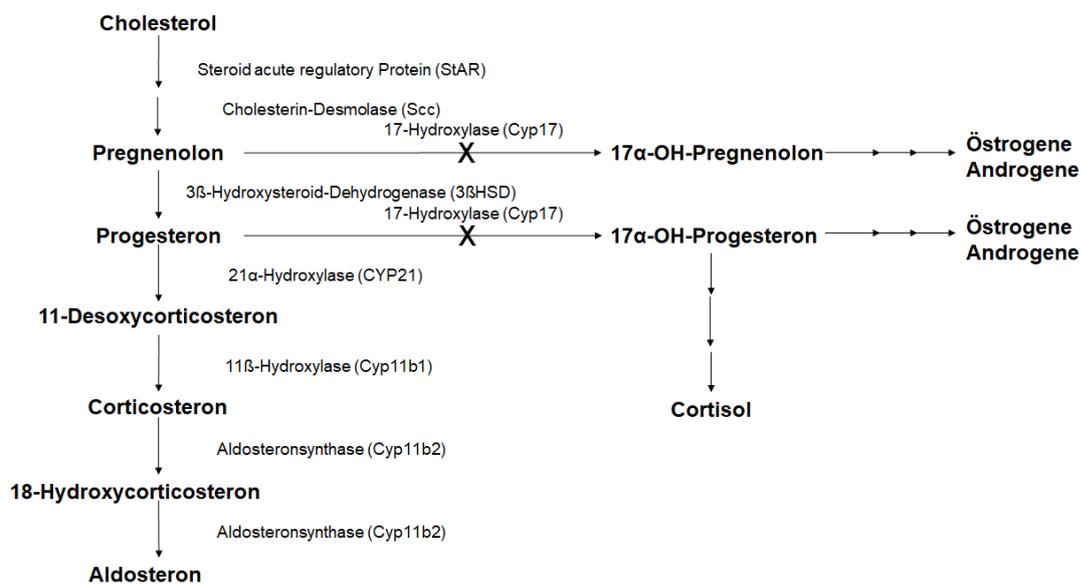


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Steroidbiosynthese bei der Maus, nach (11; 12). Im Gegensatz zum Menschen besitzen Mäuse keine 17-Hydroxylase, im Bild als X gekennzeichnet (Cyp17). Als Glukokortikoid bilden sie Corticosteron. Corticosteron wird durch die Aldosteronsynthase (Cyp11b2) zu Aldosteron umgesetzt.

1.1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) nimmt eine entscheidende Rolle bei der mittel- (Stunden bis Tage) und langfristigen (Tage bis Jahre) Blutdruckregulierung ein. Renin wird in seiner aktiven Form im juxtaglomerulären Apparat gespeichert. Fällt der arterielle Mitteldruck der Arteria renalis um einen Grenzwert von ca. 10-15 mmHg ab, wird es von den Epitheloidzellen freigesetzt (13). Renin ist eine Endopeptidase mit zwei Aspartatgruppen im aktiven Zentrum. Hydrolytisch spaltet diese ein N-terminales Dekapeptid, das Angiotensin I (ANG I), von Angiotensinogen, das von den Hepatozyten gebildet wird, ab. Das Angiotensin-

Converting-Enzym (ACE) ist ubiquitär, wird allerdings hauptsächlich von Endothelzellen der Lunge gebildet. ACE spaltet von ANG I zwei Aminosäuren ab, so dass das Oktapeptid Angiotensin II (ANG II) entsteht (9; 13). Es gibt zwei Hauptklassen von ANGII-Rezeptoren: AT₁ - und AT₂ – Rezeptoren (14). Es handelt sich dabei um eine Familie G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Der AT₁ - Rezeptor ist dabei für den Großteil der Wirkungen, aber auch Pathologien ursächlich. ANG II erfüllt bei der Blutdruckregulierung verschiedene Funktionen. An peripheren Arterien wirkt es stark vasokonstriktiv und führt durch den Anstieg des peripheren Widerstandes zu einer Steigerung des Blutdrucks. Des Weiteren stimuliert ANG II die ADH Sekretion aus dem Hypophysenhinterlappen und reguliert damit das Durstgefühl im Hypothalamus. Außerdem führt ANG II zur Ausschüttung von Noradrenalin und Adrenalin aus dem Nebennierenmark. Als eine der wichtigsten Funktionen zum Erhalt eines normalen extrazellulären Volumens und des Blutdrucks stimuliert es zudem die Ausschüttung von Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde durch eine Calcium-abhängige gesteigerte Transkription von CYP11B2 – der Aldosteronsynthese (9; 13).

Bindet ANG II an den AT₁- Rezeptor, wird eine G-Protein-Kaskade in Gang gesetzt. Über G_{αq}, Phospholipase C, Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂), Diacylglycerin (DAG) und Inositol 1,4,5-Triphosphate (IP₃) wird das intrazelluläre Ca²⁺-Signal erhöht. Dabei spielen zwei verschiedene Mechanismen eine Rolle: Die Aktivierung der Phospholipase führt zur Stimulierung des IP₃-Signalwegs (15; 16). IP₃ entsteht als Spaltprodukt von PIP₂ durch Katalysierung der Phospholipase C (17). Intrazellulär bindet IP₃ an Rezeptoren in der Membran von Calciumspeichern wie dem endoplasmatischen Retikulum/Mitochondrien. Calcium wird freigesetzt, wodurch die zytoplasmatische Calciumkonzentration ansteigt (17). Als zweiter Mechanismus führt die Bildung von DAG zu einer Hemmung der TASK-Kanäle (TWIK related acid sensitive K⁺ Channel) an der Plasmamembran der Zona glomerulosa Zellen (18). Diese Kalium-Kanäle sind unter anderem für das hyperpolarisierte Membranpotential der Zellen ursächlich. Die Leitfähigkeit von Kalium nimmt ab. Dadurch werden vor allem spannungsgesteuerte Calciumkanäle vom T-Typ aktiviert. Es kommt zu einem Calciumeinstrom von extrazellulär (18-20). Als gemeinsame Endstrecke beider Wege bildet sich ein Calcium-Calmodulin-Komplex. Transkriptionsfaktoren werden aktiviert, CYP11B2 wird in Folge vermehrt synthetisiert, was letztlich die Aldosteron-Synthese steigert (19; 21).

Durch einen hohen extrazellulären Kaliumgehalt kommt es ebenfalls zu einer Depolarisierung der Zona glomerulosa Zellen. Auch hier werden plasmamembranständige spannungsgesteuerte Calciumkanäle vom T-Typ aktiviert. Es kommt zu einem Calciumeinstrom von extrazellulär mit Bildung des Calciumcalmodulinkomplexes und letztendlich gesteigerter Aldosteronsynthese. Aldosteron führt unter anderem zu einer renalen Kaliumexkretion, womit sich ein weiterer Regulationsmechanismus konstituiert (13).

Auch ACTH stimuliert kurzfristig die Ausschüttung von Aldosteron. Für die Menge an freigesetztem Aldosteron ist unter anderem die Menge an exprimierten ACTH-Rezeptoren (MC2R) an der Oberfläche von Zellen der Zona glomerulosa entscheidend (22). Eine G-Protein-abhängige Kaskade führt zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration, die über eine gesteigerte Aktivität der Proteinkinase A letztendlich zu einer Transkription von StAR und CYP11B2 führt. Zusätzlich scheinen möglicherweise kaliumleitende Leck-Kanäle (TREK) eine Rolle zu spielen (20). Gemeinsame Endstrecke dieser stimulierenden Mechanismen ist die vermehrte Ausschüttung von Aldosteron aus der Zona glomerulosa.

Aldosteron bindet auf Grund seiner Lipophilie an intrazelluläre cytosolische Mineralkortikoidrezeptoren u.a. an den Epithelzellen der Verbindungstubuli und Sammelrohren der Niere und sorgt damit für eine Resorption von Na^+ und Cl^- durch den Einbau von luminalen ENaC – Natriumkanälen, sowie von basolateralen Natriumtransportern – Na^+/K^+ -ATPase in die Plasmamembran. Gleichzeitig werden Kalium über ROMK 1-Kanäle der apikalen Membran des kortikalen Sammelrohrs und Protonen ausgeschieden. Durch den so gesteigerten Natriumrücktransport kommt es zu einer Wasserresorption und Anstieg des extrazellulären Volumens (der Blutdruck steigt), durch den Verlust an positiven Ladungen zu einer Alkalisierung und Hypokaliämie (9; 13). Neben den Nieren entfaltet Aldosteron seine Wirkung unter anderem auch an Darm, sowie den Schweiß- und Speicheldrüsen (13).

1.2 Arterielle Hypertonie

1.2.1 Epidemiologie

Die Prävalenz der arteriellen Hypertonie liegt in Deutschland zwischen 36% und 56% (23). Basierend auf den Daten der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist weltweit jeder dritte Erwachsene – also über 2 Milliarden Menschen – von einem Bluthochdruck betroffen (vergleiche Abbildung 2), Männer dabei häufiger als Frauen. Nach Altersgruppen unterteilt, zeigt sich eine deutliche Zunahme der Prävalenz mit steigendem Alter.

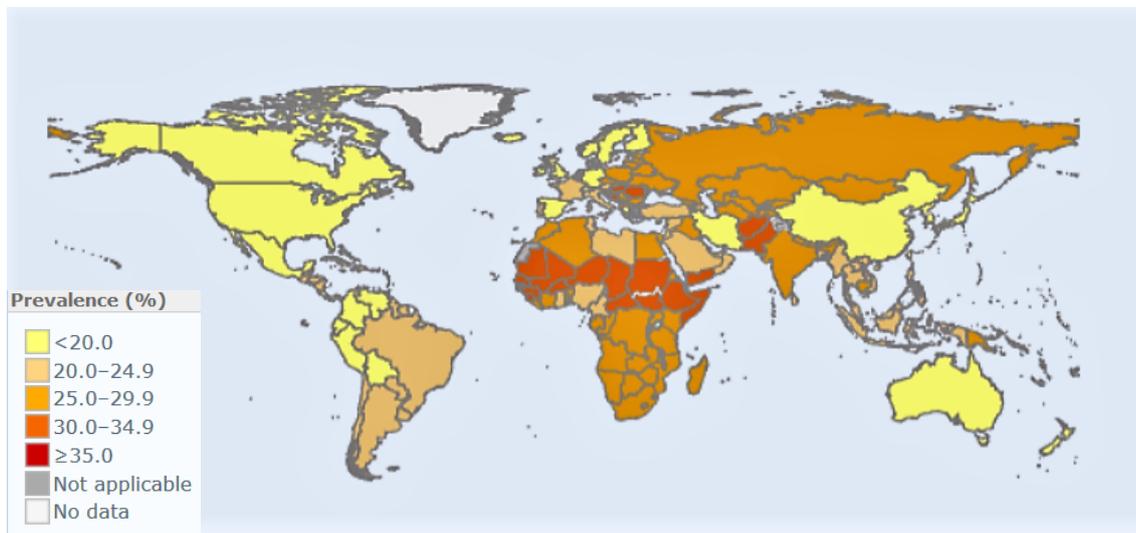


Abbildung 2: geschätzte Prävalenz von erhöhtem Blutdruck bei über 18 Jährigen, 2010-2015 nach WHO (24)

Die arterielle Hypertonie zählt zusammen mit einer LDL-Cholesterin-Erhöhung, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, einer koronaren Herzerkrankung (KHK)/Myokardinfarkt bei erstgradigen Familienangehörigen und dem Lebensalter zu den sechs Hauptrisikofaktoren einer KHK, der häufigsten Todesursache in den Industrieländern (25). Laut Statistik der WHO können 22% aller Myokardinfarkte im Westen und 13% aller Todesfälle weltweit auf eine arterielle Hypertonie zurückgeführt werden (26).

1.2.2 Definition der arteriellen Hypertonie

Eine Unterteilung des Blutdrucks anhand verschiedener Grenzwerte ist wegen des fließenden Überganges und der unimodalen Verteilung schwierig (27), jedoch auf Grund des vielfach bewiesenen Zusammenhangs zwischen erhöhten Blutdruckwerten und kardiovaskulärer bzw. chronischer Nieren-Erkrankungen klinisch relevant (28; 29). Laut der

European Society of Cardiology (ESC) liegt eine arterielle Hypertonie vor, sobald der systolische Blutdruckwert 139 mmHg und/oder der diastolische Wert 89 mmHg übersteigen (30). Außerdem wurden folgende Grenzwerte definiert:

Tabelle 1: Definition und Klassifizierung von Blutdruckwerten (mmHg) nach ESC (30)

Kategorie	Systolisch		Diastolisch
Optimal	<120	und	<80
Normal	120-129	und/oder	80-84
Hochnormal	130-139	und/oder	85-89
Grad I Hypertonie	140-159	und/oder	90-99
Grad II Hypertonie	160-179	und/oder	100-109
Grad III Hypertonie	≥180	und/oder	≥110
Isoliert systolische Hypertonie	>140	und	<90

1.2.3 Folgen und Komplikationen der arteriellen Hypertonie

Sehr häufig verläuft die arterielle Hypertonie symptomlos und wird von den Medien deshalb gerne als „silent killer“ bezeichnet (31; 32). So kann sich ein erhöhter Blutdruck in Form von morgendlichen, okzipitalen Kopfschmerzen, Schwindel, Herzklopfen, Epistaxis, Belastungsdyspnoe, Schlafstörungen und Müdigkeit äußern. Als Ausdruck des Zwischenstadiums einer arteriosklerotischen Gefäßerkrankung führt die Hypertonie zu oftmals ebenfalls asymptomatischen Endorganschäden (Tabelle 2). Besonders schwer davon betroffen sind das Gefäßsystem, Herz, Gehirn, die Augen und die Nieren (25). Ursächlich für Artherosklerose wird ein Circulus vitiosus aus Inflammation, oxidativem Stress, endothelialer Dysfunktion und einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems angesehen (33; 34).

Tabelle 2: Folgeerkrankungen der arteriellen Hypertonie modifiziert nach Herold et al. Innere Medizin 2015

Organ	Klinisch manifeste Folgeerkrankung
Gefäßsystem	<ul style="list-style-type: none"> • periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) • Bauchortenaneurysma • Aortendissektion

Herz	<ul style="list-style-type: none"> • hypertensive Kardiomyopathie mit Ausbildung einer Linksherzinsuffizienz (Todesursache bei 2/3 aller Hypertoniker) • KHK • koronare Mikroangiopathie • Endotheldysfunktion (vermehrte Bildung von vasokonstriktorischem ATII und Endothelin)
Gehirn	<ul style="list-style-type: none"> • Zerebrale Ischämie und Hirninfarkt • Hypertonische Massenblutung • Akute Hochdruckenzephalopathie
Auge	<ul style="list-style-type: none"> • Hypertonie bedingte Gefäßveränderungen am Augenhintergrund bis hin zu Schäden der Netzhaut mit bilateralem Papillenödem
Niere	<ul style="list-style-type: none"> • Hypertensive Nephropathie bis hin zur Arterioarteriolosklerotischen Schrumpfniere mit Niereninsuffizienz • Maligne Hypertonie mit sekundärer malignen Nephrosklerose

1.2.4 Ursachen der arteriellen Hypertonie

In den meisten Fällen – ca. 90% – wird keine identifizierbare Ursache für einen Bluthochdruck gefunden: Man spricht dann vom primären oder essentiellen Hypertonus, der als eine multifaktorielle und polygene Erkrankung angesehen wird (25; 35). Die wichtigsten Risikofaktoren nach WHO sind: Hoher Anteil gesättigter Fettsäuren an der Ernährung, übermäßiger Salzkonsum, Übergewicht und Adipositas, fehlende Bewegung, Alkoholkonsum, familiäre Vorbelastung, Alter über 65 Jahre und Begleiterkrankungen wie ein Diabetes mellitus. Sekundäre, d.h. durch eine spezifische Erkrankung erklärbare Hypertonien, sind neben renalen Formen und dem Schlafapnoe-Syndrom vor allem durch endokrine Ursachen bedingt (23; 35) (vergleiche Tabelle 3).

Tabelle 3: Ursachen sekundärer Hypertonieformen modifiziert nach Herold et al. Innere Medizin (2015)

Krankheitskreis	Erkrankung
Endokrine Hypertonie	<ul style="list-style-type: none"> • Primärer Hyperaldosteronismus (Conn-Syndrom) • Sekundärer Hyperaldosteronismus

	<ul style="list-style-type: none"> • Phäochromozytom • Akromegalie • Morbus Cushing / Cushing Syndrom • Hyperthyreose
Renale Hypertonie	<ul style="list-style-type: none"> • Renoparenchymatöse Erkrankungen (z.B. Glomerulonephritis, diabetische Glomerulosklerose etc.) • Renovaskuläre Hypertonie (Nierenarterienstenose)
Schlaferkrankung	<ul style="list-style-type: none"> • Schlafapnoe-Syndrom
Andere sekundäre Hypertonieformen	<ul style="list-style-type: none"> • Aortenisthmusstenose, Aortensklerose • Neurogen (z.B. bei Enzephalitis) • Psychogen (z.B. bei Schmerzen) • Systemischer Lupus erythematoses (SLE), Vaskulitiden • Iatrogen (Ovulationshemmer, Steroide, NSAR) • Lakritz • Toxisch/Drogen
Monogenetische Hypertonieformen	<ul style="list-style-type: none"> • Seltene Formen des Adrenogenitalessyndrom (AGS) • Liddle-Syndrom • Gordon-Syndrom • Glukokortikoid-supprimierbarer Hyperaldosteronismus

1.3 Primärer Hyperaldosteronismus/Conn-Syndrom

1.3.1 Prävalenz und Geschichte des Primären Hyperaldosteronismus

Der primäre Hyperaldosteronismus wurde erstmals 1955 vom amerikanischen Endokrinologen Jerome W. Conn beschrieben. Über einen Zeitraum von einem Jahr – vom April 1954 bis April 1955 – kontrollierte er an 227 Tagen den Metabolismus einer 34-jährigen Patientin, die neben einer schweren Hypertonie auch an Muskelkrämpfen und Lähmungserscheinungen litt. In seinen Kontrollen entdeckte er unter anderem eine Hypokaliämie, Hybernatriämie, metabolische Alkalose und eine erhöhte Aldosteronkonzentration im Urin. Ursache war ein aldosteronproduzierendes Adenom der Nebenniere (36; 37).

Der Primäre Hyperaldosteronismus (PA) oder auch Conn-Syndrom genannt, ist die häufigste Ursache der sekundären Hypertonie. Zwischen 6 und 12% aller Bluthochdruckpatienten leiden an einem Conn-Syndrom (38; 39). Unter den Patienten mit therapieresistentem Hypertonus steigt die Prävalenz weiter bis auf 20% an (40). Selbst bei etwa 3 % der „low-risk“ Patienten – solchen mit Normokaliämie und nur milder bis moderater Hypertonie – lässt sich ein primärer Hyperaldosteronismus diagnostizieren (41). Bei 80 Millionen Einwohnern in Deutschland, einer Hypertonie Prävalenz von 40% und einer Prävalenz des Conn-Syndroms von 6% gibt es in Deutschland ca. 2.000.000 Erkrankte (42).

1.3.2 Klinik

Durch die vermehrte Produktion von Aldosteron kommt es in den Hauptzellen der Verbindungstubuli und Sammelrohren der Nieren zu einer Resorption von Natrium und nachfolgend freiem Wasser. Umgekehrt werden Kalium und Protonen ausgeschieden. Folge der Natriumretention ist eine Volumenüberladung. Klinisch resultiert eine Hypertonie mit all den oben beschriebenen Symptomen und Folgeerkrankungen, sowie eine mögliche Hypokaliämie. Leitsymptome einer Hypokaliämie können Muskelschwäche, Muskelkrämpfe, Parästhesien, EKG-Veränderungen, Polyurie und Polydipsie sein (43). Allerdings findet sich eine solche Hypokaliämie bei lediglich ca. 50% der Patienten mit aldosteronproduzierendem Adenom und ca. 17% mit idiopathischem Hyperaldosteronismus, so dass häufig Symptome einer Hypokaliämie fehlen (44). Der Plasmareningehalt ist typischerweise erniedrigt, woraus ein hoher Aldosteron-Renin-

Quotient resultiert. Patient werden meist auffällig durch entweder Verschlechterung der Hypertonie oder auf Grund von Symptomen des Kalium Verlustes (25; 44).

Nach aktueller Studienlage treten kardiovaskuläre Komplikationen – wie Apoplex und Endorganschäden – bei Patienten mit Primärem Hyperaldosteronismus häufiger auf, als bei Patienten mit essentiellen Hypertonus und sonst vergleichbaren kardiovaskulären Risikofaktoren (45; 46).

1.3.3 Diagnostik

Um Patienten mit essentieller Hypertonie von solchen mit Conn-Syndrom zu unterscheiden und so Morbidität und Mortalität durch eine zielgerichtete Therapie positiv beeinflussen zu können, ist eine frühzeitige und genormte Diagnostik unverzichtbar (45; 46).

Indikationen für ein Screening auf Conn-Syndrom sind (47):

Tabelle 4: Indikationen für Screening auf Conn-Syndrom (47)

Therapieresistenter Hypertonus (≥ 3 Antihypertensiva und RR $>140/90$ mmHg)
Kontrollierter Blutdruck unter ≥ 4 Antihypertensiva
Hypertonie mit Hypokaliämie
Hypertoniker mit positiver Familienanamnese vor dem 40. Lebensjahr oder cerebrovaskulärem Ereignis vor dem 40. Lebensjahr
Nebenniereninzidentalom mit Hypertonie
alle Grad II und III Hypertoniker
Grad I Hypertoniker mit Conn-Syndrom-Patienten als Verwandte ersten Grades
Hypertoniker mit Schlafapnoesyndrom

Als primäre Screening-Methode wird eine morgendliche Blutabnahme mit Bestimmung des Aldosteron-Renin-Quotienten empfohlen. Wird dabei ein je nach verwendetem Assay variabler Grenzwert überschritten ist das Vorliegen eines Conn-Syndroms wahrscheinlich. Zur Bestätigung der Diagnose sollte im Anschluss ein Kochsalzbelastungstest oder Captopriltest durchgeführt werden. Die morphologische Beurteilung der Nebennieren erfolgt meist mittels Dünnschicht-CT. Bei Verdacht auf das Vorliegen eines Aldosteronproduzierendes-Nebennierenadenoms und sowohl technisch möglicher als auch vom Patienten gewünschter Operation kommt ein selektiver Nebennierenvenenkatheter zur definitiven Unterscheidung zwischen Adenom und bilateraler Hyperplasie zum Einsatz.

Liegt ein signifikanter seitenabhängiger Gradient vor ist ein Aldosteron-produzierendes-Adenom bestätigt (47-49).

1.3.4 Therapie

Liegt ein Aldosteron-produzierendes-Adenom oder eine unilaterale Hyperplasie vor, wird eine unilaterale laparoskopische Adrenektomie empfohlen. Daraufhin kommt es bei fast 100% der Patienten zur Besserung der Hypertonie und einer Heilungsrate von 30-40% (50; 51). Als Heilung wird ein Blutdruck von <140/90mmHg ohne Einsatz von Antihypertensiva definiert (47; 50; 51).

Entscheidet sich der Patient gegen eine operative Therapie oder handelt es sich um eine bilaterale Hyperplasie kommen Aldosteronrezeptorantagonisten zum Einsatz (47; 50-52).

1.3.5 Molekulare Ursachen des primären Hyperaldosteronismus

Die häufigsten Ursachen für einen primären Hyperaldosteronismus sind mit etwa 60% die bilaterale Nebennierenhyperplasie und mit etwa 30% das unilaterale Nebennierenadenom (38). Zu beachten sind allerdings Zentren-spezifische Unterschiede, die durch Ethnien oder unterschiedliche differenzialdiagnostische Abläufe zu erklären sind. Nur bei einer kleinen Minderheit sind differenzierte Keimbahnmutationen für einen primären Hyperaldosteronismus verantwortlich (38; 53).

Durch Next-Generation-Sequenzierung wurde kürzlich eine ganze Reihe von Mutationen entdeckt, die sowohl den familiären-, als auch den somatischen Hyperaldosteronismus bedingen können. Hauptsächlich betroffen sind Gene, die direkt oder indirekt Calcium-abhängige Signalwege beeinflussen. Die wichtigsten bisher bekannten Mutationen finden sich in den Genen: *KCNJ5* (54), *ATP1A1/ATP2B3* (42) und *CACNA1D* (55; 56). In einer großangelegten multizentrischen Studie ließen sich bei über 50% aller aldosteronproduzierenden Adenome somatische Mutationen in diesen Genen finden (53).

1.3.5.1 KCNJ5-Gen

Die wichtigsten für einen primären Hyperaldosteronismus ursächlichen Mutationen liegen im *KCNJ5*-Gen (57). Sowohl somatische als auch Keimbahnmutationen wurden für dieses Gen beschrieben. Fernandes-Rosa et al. fanden 180 heterozygote *KCNJ5*-Mutationen in 474 aldosteronproduzierenden Tumoren, was einer Prävalenz von 38% entspricht (53). Die

beiden Hotspotmutationen sind dabei die p.Gly151Arg (c.G451A) und die p.Leu168Arg (c.T503G) Mutation, die mit zusammen 34% den größten Anteil ausmachen (Abbildung 3). Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt eine andere großangelegte Studie, in der die beiden Mutationen bei 47% aller aldosteronproduzierenden Adenomen identifiziert werden konnten (58). Generell scheint dabei die G451A Mutation häufiger zu sein, als die T503G Mutation mit 20 gegenüber 14% (53) bzw. 25 gegenüber 21% (58).

Choi et al. waren 2011 die Erstbeschreiber dieser Mutationen, lieferten gleichzeitig einen pathophysiologischen Erklärungsansatz und klärten über die Struktur des Kanals auf (54): *KCNJ5* kodiert für Girk4/Kir3.4, einen auswärts gerichteten G-Protein aktivierten Kaliumkanal. Kir3.4 wird in Zellen der Zona Glomerulosa der Nebenniere exprimiert und besitzt eine hohe Ruhe-Leitfähigkeit für Kalium. Dies führt zu einem stark negativen Ruhemembranpotenzial. Zur Depolarisation der Zellen kommt es entweder durch eine extrazellulär erhöhte Kaliumkonzentration oder durch ein Angiotensin II vermitteltes Schließen dieser Kaliumkanäle. Beides führt zu einer Aktivierung von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen und einem Ca^{2+} Einstrom in die Zelle. Calciumvermittelt wird die Zellproliferation angeregt und induziert eine vermehrte Produktion von Enzymen, unter anderem der Aldosteronsynthase, die eine entscheidende Rolle bei der Biosynthese von Aldosteron spielen.

Die beiden am häufigsten identifizierten Mutationen liegen in (G451A) bzw. direkt am (T503G) Selektivitätsfilter des Kanals und ändern dessen Konformation. Der Kanal wird dadurch vermehrt permeabel für Na^+ -Ionen. Es kommt zu einem chronischen Einstrom von Natrium und einer Depolarisation der Zellen, die wiederum zu einer vermehrten Synthese von Aldosteron und einer gesteigerten Zellproliferationsrate führt (schematisch Darstellung des Mechanismus in Abbildung 4a). Zusätzlich wurde bei einer Familie mit schwerer Hypertension, Hyperaldosteronismus und bilateraler adrener Hyperplasie eine heterozygote Keimbahnmutation (T158A) entdeckt. Diese führt ebenfalls zu einer reduzierten Selektivität des Kaliumkanals (54).

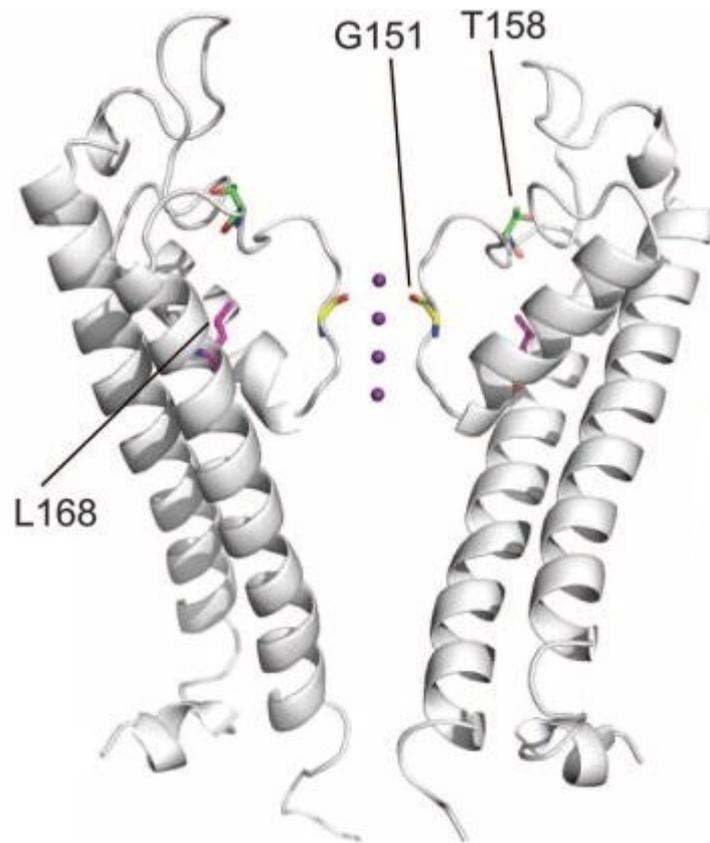


Abbildung 3: Ort der humanen KCNJ5 Mutationen schematisch am K⁺ Kanals KCNJ12 des Huhns. Humane KCNJ5 und KCNJ12 Kanäle des Huhns sind bezüglich ihres Selektivitätsfilters zu 89% identisch. G151 (G451A) liegt direkt im Selektivitätsfilter des K⁺ Kanals. T158 liegt direkt oberhalb des Filters. L168 (T503G), die zweite weitere somatische Mutation, liegt in der inneren Helix und ist in Richtung des selektivitätsfilters gewandt (54).

Vergleicht man die Patienten mit aldosteronproduzierenden Adenom untereinander fällt ein höherer Anteil von Frauen auf. Statistisch gesehen kann bei jeder zweiten Frau (49%) mit aldosteronproduzierenden Adenom eine Mutation in diesem Gen gefunden werden. Bei den Männern ist es nur jeder fünfte (19%). Patienten mit Mutation im KCNJ5 Gen waren außerdem signifikant jünger bei Diagnose, als Patienten ohne eine solche Mutation (42 vs. 48 Jahre). Zusätzlich sind bei Diagnosestellung die Plasma-Aldosteron-Level der Patienten mit KCNJ5-Mutation, verglichen mit Patienten ohne eine solchen Mutation, signifikant erhöht (58; 59). Adenome mit Mutation im Girk4 Kaliumkanal sind zudem signifikant größer als Adenome ohne Mutation (27,1 vs. 17,1mm) (58).

Interessanterweise sind Mutationen im Girk4 auch für mindestens ein weiteres Krankheitsbild ursächlich (60). Immunhistochemische Färbungen zeigten, dass Kir3.4 nicht nur in der Nebenniere, sondern in großen Mengen auch in der Skelettmuskulatur und im Herzen exprimiert wird. Kürzlich wurde eine G387R Keimbahn-Mutation im KCNJ5 Gen bei

einer chinesischen Familie beschrieben. Elektrophysiologische Daten zeigten, dass der so mutierte Kanal mit einem weiteren Kalium-Kanal (Kir2.1) interagiert. Mutierter Kir3.4 coexprimiert mit Kir2.1 führte zu einer signifikanten Reduktion des Kaliumstroms. Das resultierende Krankheitsbild entspricht dem eines Andersen-Tawil-Syndroms, einer Form des Long-QT-Syndroms. Neben der G387R Mutation wurde bei einem Patienten eine T158A Mutation entdeckt. Sie wird ebenfalls von den Autoren verdächtigt, ein Long-QT-Syndrom auslösen zu können. Dabei handelt es sich genau um eben jene Mutation, die bereits als Auslöser des familiären Hyperaldosteronismus erkannt wurde (60).

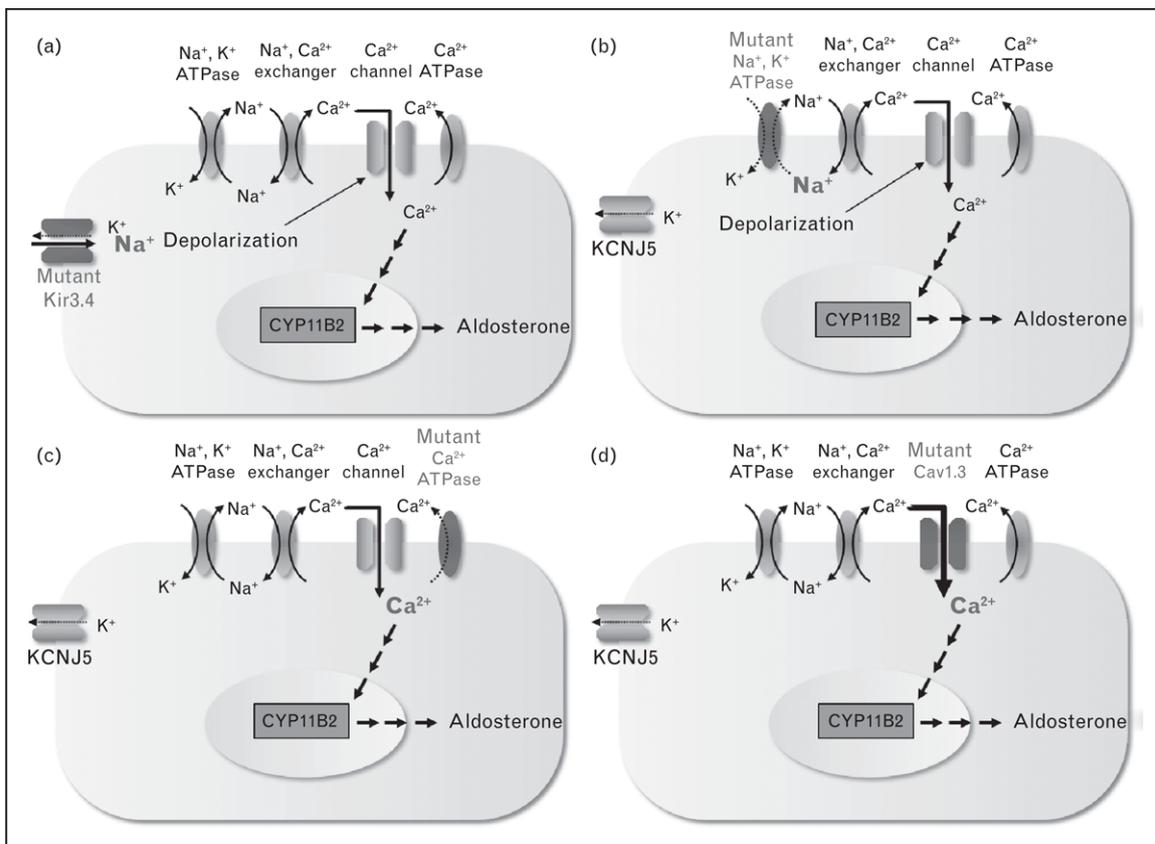


Abbildung 4: Postulierte Pathomechanismen die zu einer abnormen autonomen Aldosteronsekretion führen (61). In der gesunden Nebenniere sind Kalium-, Calcium-Kanäle und ATP-asen an der Erhaltung einer hyperpolarisierten Zellmembran in der Zona glomerulosa beteiligt. (a) Mutationen im *KCNJ5*-Gen führen zu einem einwärtsgerichteten Natrium-Leakstrom durch den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kir3.4 und so zu einer Depolarisation der Zelle. (b) Mutationen im *ATP1A1*-Gen führen ebenfalls zu einem einwärtsgerichteten Natrium-Leakstrom, hier durch die Natrium/Kalium-ATPase, welcher zur Depolarisation der Zelle führt. (c) *ATP2B3* kodiert für eine Ca^{2+} -ATPase. Durch eine Mutation wird Calciumionen werden vermindert aus dem Cytoplasma in den Extrazellularraum gepumpt. Der intrazelluläre Calciumgehalt ist dauerhaft erhöht. (d) Mutationen im *CACANA1D*-Gen führen zu einer abnorm gesteigerten Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen des spannungsabhängigen Calciumkanals, was letztlich wiederum zu einer gesteigerten Expression und Liberation von Aldosteron führt (42; 61).

1.3.5.2 ATP1A1/ATP2B3-Gen

In einer groß angelegten Studie von Beuschlein et al. wurden 309 aldosteronproduzierende Adenome sequenziert. Dabei konnten bei 5,2% der Patienten somatische Mutationen im ATP1A1 Gen und bei 1,6% Mutationen im ATP2B3 Gen gefunden werden (42). Das Fehlen von Keimbahnmutationen unterstreicht die in der Zell-Physiologie zentrale Rolle der beiden ATPasen und lässt auf mit dem Leben nicht vereinbare Mutationen schließen. Die mit ATP1A1/ATP2B3 Mutationen vergesellschafteten Adenome sind, verglichen mit Adenomen mit Mutation im *KCNJ5*- Gen, deutlich kleiner – zum Teil <0,5 cm – und waren aus kompakteren, Zona Glomerulosa ähnlichen Zellverbänden aufgebaut (56). Ähnlich den aldosteronproduzierenden Adenomen mit *KCNJ5*-Mutation zeigten Mutationsträger ein erhöhtes Plasma Aldosteronlevel und ein erniedrigtes K^+ . Im Gegensatz dazu waren 81% der Patienten mit ATP1A1/ATP2B3 Mutation männlich, bei *KCNJ5*-Mutationsträgern waren es nur 25,4% (42).

ATP1A1 codiert für eine Na^+/K^+ ATPase α -Untereinheit. Na^+/K^+ ATPasen sind Transmembranproteine die unter Hydrolyse von ATP den Transport von drei Na^+ -Ionen gegen das Konzentrationsgefälle aus der Zelle und K^+ -Ionen in die Zelle hinein katalysieren und somit essentiell für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials und die Generierung von Aktionspotentialen sind (62). Es konnte gezeigt werden, dass unter physiologischen Bedingungen somatische Mutationen in diesem Gen einen einwärtsgerichteten Leak-Strom von Na^+ -Ionen oder Protonen verursachen können (56). Eine daraus resultierende Depolarisation führt zu einem Ca^{2+} Influx, der letztendlich eine Aldosteron Produktion und Freisetzung zur Folge hat (vergleiche Mechanismus Abbildung 4b). Diese Hypothese wird durch *in vitro* Experimente gestützt: zum einen war die Leistung der Na^+/K^+ -Pumpe und die Affinität der Na^+/K^+ -ATPase zu K^+ -Ionen reduziert, zum anderen zeigten mutierte Primärkulturzellen bei der elektrophysiologischen Untersuchung einen höheren Grad der Depolarisation. Auch bei den Zellen mit Mutation im ATP2B3 Gen kam man zu denselben elektrophysiologischen Ergebnissen (42).

Wie ATP1A1 gehört ATP2B3 zur Familie der Gene, die für ATPasen codieren, in diesem Fall eine Ca^{2+} -ATPase – PMCA3. Die Plasmamembran Ca^{2+} -Pumpe dient dazu Ca^{2+} -Ionen gegen einen Konzentrationsgradienten aus dem Cytosol in den extrazellulär Raum zu

pumpen und spielt somit eine entscheidende Rolle in der Homöostase des Ca^{2+} -Signalweges (63). Es wird vermutet, dass es durch eine Mutation in diesem Gen zu einer stark veränderten Struktur der Bindestelle für Ca^{2+} -Ionen und einem loss-of-function Effekt kommt. Cytoplasmatische Ca^{2+} -Ionen werden nicht mehr hinaus transportiert. Der intrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration ist damit dauerhaft erhöht, was wiederum zu einer vermehrten Synthese und Liberation von Aldosteron führt (vergleiche Mechanismus Abbildung 4c) (42).

1.3.5.3 CACNA1D-Gen

CACNA1D codiert für die α 1D-Untereinheit eines spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals, den $\text{Ca}_v1.3$. Bei Zona glomerulosa ähnlichen aldosteronproduzierenden Adenomen wurden in diesem Gen kürzlich einige, sowohl somatische, als auch Keimbahn-Mutationen gefunden (55; 56). Als Ursache für den Hyperaldosteronismus wird ein gain-of-function Effekt angenommen. Durch die Mutationen wird der Kanal noch permeabler für Ca^{2+} -Ionen. Es kommt zu einer Verstärkung des Ca^{2+} vermittelten Signalwegs und letztendlich einer gesteigerten Aldosteronsekretion (42; 55; 61) (vergleiche Mechanismus Abbildung 4d). Analog zur *KCNJ5*-Mutation wurden bei Kindern einzelne Keimbahnmutationen exakt an derselben Stelle wie somatische Mutationen entdeckt. Dies stützt die Theorie, dass eine einzelne derartige Mutation ausreicht, um einen Aldosteron-Exzess zu verursachen. In beiden Fällen waren die Eltern keine Träger der Mutation (55). Interessanterweise führen homozygote loss-of-function Mutationen des CACNA1D-Gens zu kongenitaler Taubheit, Arrhythmien und Bradykardie (64).

Ähnlich den Adenomen mit ATP1A1/ATP2B3-Mutation, lassen sich Aldosteronproduzierende Adenome mit einem veränderten $\text{Ca}_v1.3$, hauptsächlich bei älteren Männern mit kleinen Adenomen finden. Die Mutationen in diesem Gen sind mit 8-9% ebenfalls recht häufig (53; 55).

1.4 Zielsetzung dieser Dissertationsarbeit

Wie dargelegt betrifft der primäre Hyperaldosteronismus eine große Zahl an Patienten mit Bluthochdruck und ist in besonderem Maße mit schweren kardiovaskulären und metabolischen Folgeerkrankungen vergesellschaftet. Als klinisch häufigste und bedeutsamste Mutation, steht in dieser Dissertationsschrift die Entwicklung eines murinen KCNJ5-Mutationsmodells im Fokus.

Der genaue Einfluss dieser Mutation auf den Mechanismus einer autonomen Aldosteron-Sekretion und auf zellproliferative Effekte ist nach wie vor nicht geklärt. Die in dieser Arbeit beschriebenen transgenen Mauslinien sollten eine zielgerichtete Expression des mutierten KCNJ5-Gens in der Nebennierenrinde ermöglichen. So könnten sich funktionelle Effekte auf die Hormonproduktion und mögliche Kompensationsmechanismen abschätzen lassen. Die Verbesserung der Diagnostik und Entwicklung neuer Therapieformen ist in hohem Maße abhängig vom genauen Verständnis dieser pathophysiologischen Grundlagen, da solche Mutationen ein mögliches therapeutisches Target darstellen können.

Ziel der Arbeit war der Nachweis des eingebrachten Plasmids, der Nachweis und die Quantifizierung von KCNJ5-cDNA, die Darstellung möglicher Unterschiede zwischen den Geschlechtern, sowie die Untersuchung von möglichen Kurzzeiteffekten, eine funktionelle Testung und die Erfassung von Langzeiteffekten im in vivo Modell.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Zubehör

Tabelle 5: verwendete Gerätschaften

Bio-Rad Powerpac 300, 1000	Bio-Rad Laboratories, München
Biosphere Filterspitze	Sarstedt, Nümbrecht
Bunsenbrenner Labogaz 206	Camping Gaz, Hattersheim
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Delfia Plateshaker	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
EC-350-Paraffin-Ausgießstation	Microm, Walldorf
ELISA Microplates 96-Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Glaskapillaren	Brand, Wertheim
Heraeus Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
HM 335 E Rotationsmikrotom	Microm, Walldorf
Käfige	TDI, Alcobendos, Spanien
Leica DM 2500 Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Maxwell	Promega, Mannheim
Menzel Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Microsoft Office 2016	Microsoft, Redmond, WA, USA
Mikrowelle	Bomann, Kempen
Mini Sub-Cell GT Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Mx3000P Stratagene qPCR Cycler	Stratagene, La Jolla, CA, USA
MxPro V.4.01 Software	Stratagene, La Jolla, WI, USA
NanoDrop ND-1000	PEQLAB, Erlangen
Ohrmarken und Ohrzange	Hartenstein, Würzburg
Pipette Research plus	Eppendorf, Hamburg
Pipette Xplorer	Eppendorf, Hamburg
Primus 25 advanced PCR Machine	PEQLAB, Erlangen
Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg
Skalpelle	PFM, Köln
Spot Basic Software V4.09	Spot, Burroughs, MI, USA
Stereomikroskop	Carl Zeiss, Jena
STP Spin 120 Gewebereinbettungsautomat	Microm, Walldorf
Sub-Cell GT Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tierfutter	Ssniff Spezialdiäten, Soest
UV-Kamera	INTAS UV-System, Göttingen
VICTOR Multilabel Plate Reader	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Zuchtkäfige	Zoonlab, Castrop-Rauxel

2.2 Chemikalien und Kits

Tabelle 6: verwendete Chemikalien und Kits

3,3-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose	PEQLAB, Erlangen
Anti-KCNJ5-Antikörper polyclonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aqua ad injectabilia	Braun, Tuttlingen Aqua
Aqua destillata	Apotheke, Uni München, Campus Innenstadt
Biotinylated goat anti-rabbit IgG	Vector Laboratories, CA, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
DELTA Eu-N1 Streptavidin	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
dNTP Mix	Promega, Mannheim
Eosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol 100 %, 96%, 70%	Apotheke, Uni München, Campus Innenstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fast EVA Green qPCR Master Mix	Biorad Laboratories Berkley, CA, USA
Forene – Isofluran	Abbott GmbH, Wiesbaden
GeneRuler 100 bp DNA Leiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Histoacryl	Braun, Tuttlingen
Loading Dye 6x	Fermentas, St. Leon-Rot
Maxwell RSC simplyRNA Tissue Kit	Promega, Mannheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid 0.9%	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Oligo (dT)15 Primer	Promega, Mannheim
Paraffin	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PCI (Chloroform:Isoamylalkohol 24:1)	Apotheke, Uni München, Campus Innenstadt
Phosphate buffered Saline, PBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K	Promega, Mannheim
ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep System	Promega, Mannheim
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Synacthen – ACTH	Novartis, Nürnberg
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Xylol	Merck, Darmstadt
Ziegenserum	Jackson ImmunoResearch Lab, PA, USA

2.3 Puffer, Lösungen und Gele

Tabelle 7: verwendete Puffer, Lösungen und Gele

1%iges Agarosegel	Agarose 1 mg TBE 1x 100 ml Schmelzen der Agarose in der Mikrowelle Ethidiumbromid 5 µl
4%ige Paraformaldehyd-Lösung	PFA 40 g 1x PBS-Lösung 1000 ml unter der Abzugshaube auf 65 °C erwärmen Aufbewahrung bei -20 °C
Blocking Buffer	Blocking Solution 95 µl Ziegenserum 5 µl
Blocking Solution	Rinderserumalbumin 3g Ad PBS 100 ml
Citratpuffer	Natriumcitrat 2,94 g Salzsäure bis pH = 6 hinzufügen ad 1000ml Aqua dest.
TBE 10x Puffer	Tris 108 g Borsäure 55 g EDTA 7,4 g Aqua dest. 1000 ml Salzsäure bis pH=8,2
TE-Puffer	Tris 10 mM pH 8,0 EDTA 1 mM
TNES-Puffer	Tris 10 mM, pH 7,5 NaCl 400 mM EDTA 100 mM SDS 0,6%

2.4 Versuchstiere

2.4.1 Generierung der transgenen Tiere

Die Generierung der Mäuse, wie auch die sich anschließenden Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt. Es wurden drei verschiedene Vektoren generiert. Einer mit vollständiger humaner *KCNJ5* wildtyp Sequenz, einer mit der *KCNJ5* G451A (=G151R) Mutation und einer mit *KCNJ5* T503G (=L168R) Mutation (vergleiche

Sequenz Abbildung 5, Aufbau der Vektoren Abbildung 6, 7). Diesen Sequenzen wurde jeweils ein 0,5 kb Fragment der Promotorregion des Akr1b7 Gens vorgeschaltet. In vorangehenden Studien konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe dieser Promotorsequenz eine weitgehend Nebennierenrinden-spezifische Expression bei transgenen Tieren erzielt werden kann (65).

10	20	30	40	50
MAGDSRNAMN	QDMEIGVTPW	DPKKIPKQAR	DYVPIATDRT	RLLAEGKKPR
60	70	80	90	100
QRYMEKSGKC	NVHHGNVQET	YRYLSDLFTT	LVDLKWRFNL	LVFTMVTYVT
110	120	130	140	150
WLFFGFIWWL	IAYIRGDLDH	VGDQEWIPCV	ENLSGFVSAF	LFSIETETTTI
160	170	180	190	200
G YGFRVITEK	CPEGIILL L LV	QAILGSIVNA	FMVGCMFVKI	SQPKKRAETL
210	220	230	240	250
MFSNNAVISM	RDEKLCLMFR	VGDLRNSHIV	EASIRAKLIK	SRQTKEGEFI
260	270	280	290	300
PLNQTDINVG	FDTGDDRLFL	VSPLIISHEI	NQKSPFWEMS	QAQLHQEEFE
310	320	330	340	350
VVILEGMVE	ATGMTCQARS	SYMDTEVLWG	HRFTPVLTLLE	KGFYEVDYNT
360	370	380	390	400
FHDTYETNTP	SCCAKELAEM	KREGRLLOYL	PSPPLLGGCA	EAGLDAEAEQ
410				
NEDEPKGLG	GSREARGSV			

Abbildung 5: Aminosäuresequenz des KCNJ5 Gens. Hellgrau hinterlegt und dickgeschrieben wurden die G151R (=G451A) sowie die L168R (=T503G) Mutation. Entsprechend wird bei der G151R Mutation Arginin statt Glycin, bei der L168R Mutation Arginin statt Leucin exprimiert.

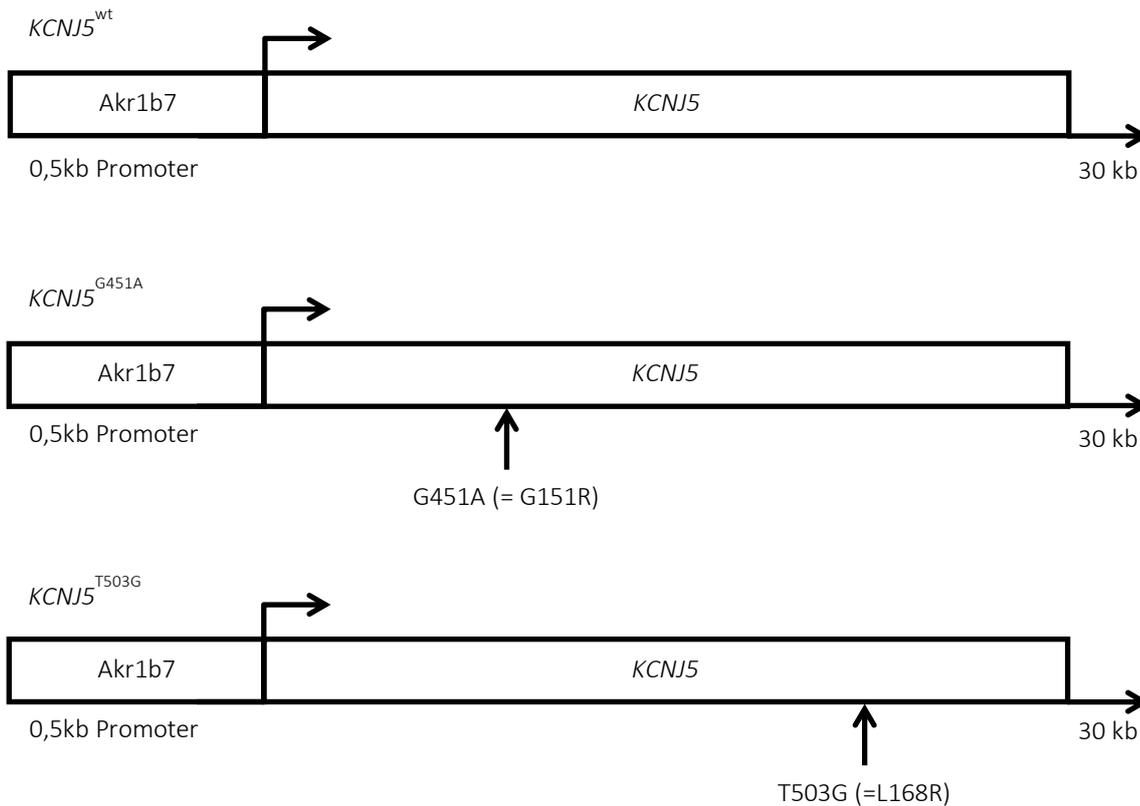


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des inserierten Genkonstrukts. Drei verschiedene Vektoren mit dem vollständigen KCNJ5 Gen in der wildtyp Sequenz, mit der G451A (=G151R) und mit der T503G (=L168R) Mutation wurden generiert. Der Targeting Vektor enthielt ein 0.5 kb Fragment der Promoter Region des Akr1b7 Gens, mit dessen Hilfe das eingebrachte Gen nebennierenspezifisch exprimiert werden sollte. Durch Pronukleusinjektion wurden C57BL/6 Mäuse geschaffen die entweder die volle Länge des humanen KCNJ5 wildtyp Gens, oder die volle Länge der Mutanten KCNJ5G451A bzw. KCNJ5T503G enthielten.

Die Generierung der transgenen Mäuse fand am Lehrstuhl für molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität statt. Via Pronukleusinjektion wurden transgene Foundertiere generiert. Als Donormäuse wurden C57BL/6 Mäuse genutzt. Als Empfänger diente die Auszuchtmaus des Stammes NMRI. Nach Superovulation erfolgte die Injektion des DNS-Konstrukts in den Pronukleus der Zygote. Die Embryonen wurden in scheinchwangere Ammenmütter transferiert. Es entstanden transgene Tiere, die die verschiedenen Vektoren enthielten. Transgene Foundertiere wurden mit C57BL/6-Mäusen weiterverpaart.

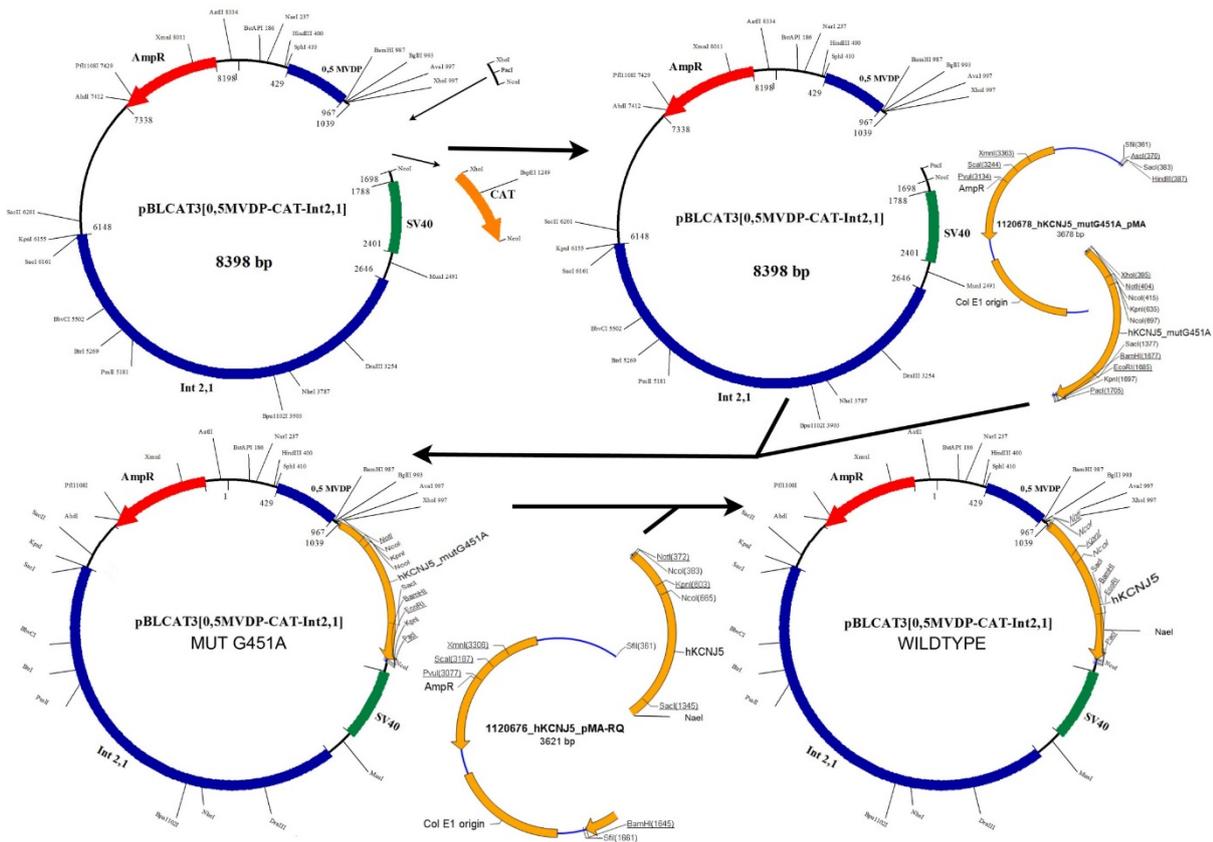


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des inserierten Plasmids

2.4.2 Genotypisierung der Tiere

Um die Prozedur der Genotypisierung für die Tiere so stressfrei wie möglich zu gestalten, wurden die Mäuse alle in einem Alter von 3 Wochen via Isofluran in eine Kurznarkose gelegt. Dazu wurde ein Glasbehälter mit frischen Papiertüchern ausgekleidet und diese mit dem Narkotikum getränkt.

Zur Identifizierung wurden die Mäuse mit einer Ohrenmarke aus Messing versehen und bekamen auf diese Weise eine Nummer zugeordnet.

Während der Markierung mit Ohrenmarke wurde den Tieren zur Gewinnung von genomischer DNA ein ca. 3 mm großes Stück Schwanz-Biopsat entnommen. Dafür wurde die Klinge eines Skalpell mit Bunsenbrenner bis zum Glühen erhitzt und das Stück Schwanz abgetrennt. Kleine Blutungen wurden dadurch kauterisiert. Die Biopsate wurden zunächst mit Hilfe des ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep Systems nach Angaben des Herstellers bearbeitet. Aus Kostengründen wurde im Verlauf nach einem Protokoll der Arbeitsgruppe gearbeitet. Hierfür wurden die Schwänze über Nacht bei 55°C in TNES-Puffer

und Proteinase K inkubiert. 166 µl einer 6molaren NaCl-Lösung und 100 µl PCI wurden hinzugefügt. Das Gemisch wurde zentrifugiert und abepipettiert. Mit Hilfe von vorgekühltem Ethanol wurde die DNA ausgefällt. Zur Entnahme wurden Glaskapillaren mit Hilfe eines Bunsenbrenners verschlossen, in Ethanol getaucht und die DNA daran aufgedreht. Nach Trocknen erfolgte die Resuspension in TE-Puffer.

In der aus den Mausschwänzen isolierten DNA konnte bei Nachfahren der jeweiligen Founder-Tiere – *KCNJ5^{wt}*, *KCNJ5^{G451A}* und *KCNJ5^{T503G}* – nach PCR und Gelelektrophorese eine Bande auf selber Höhe wie das isolierte Plasmid nachgewiesen werden. Bei Wildtyp Tieren – Mäusen ohne Plasmid – fand sich keine. Als Positiv-Kontrolle zum Nachweis muriner DNA fungierte β-actin. Entsprechend zeigte sich nach PCR des Plasmids keine β-actin Bande. Als Negativ-Kontrolle wurde destilliertes Wasser verwendet (Abbildung 8).

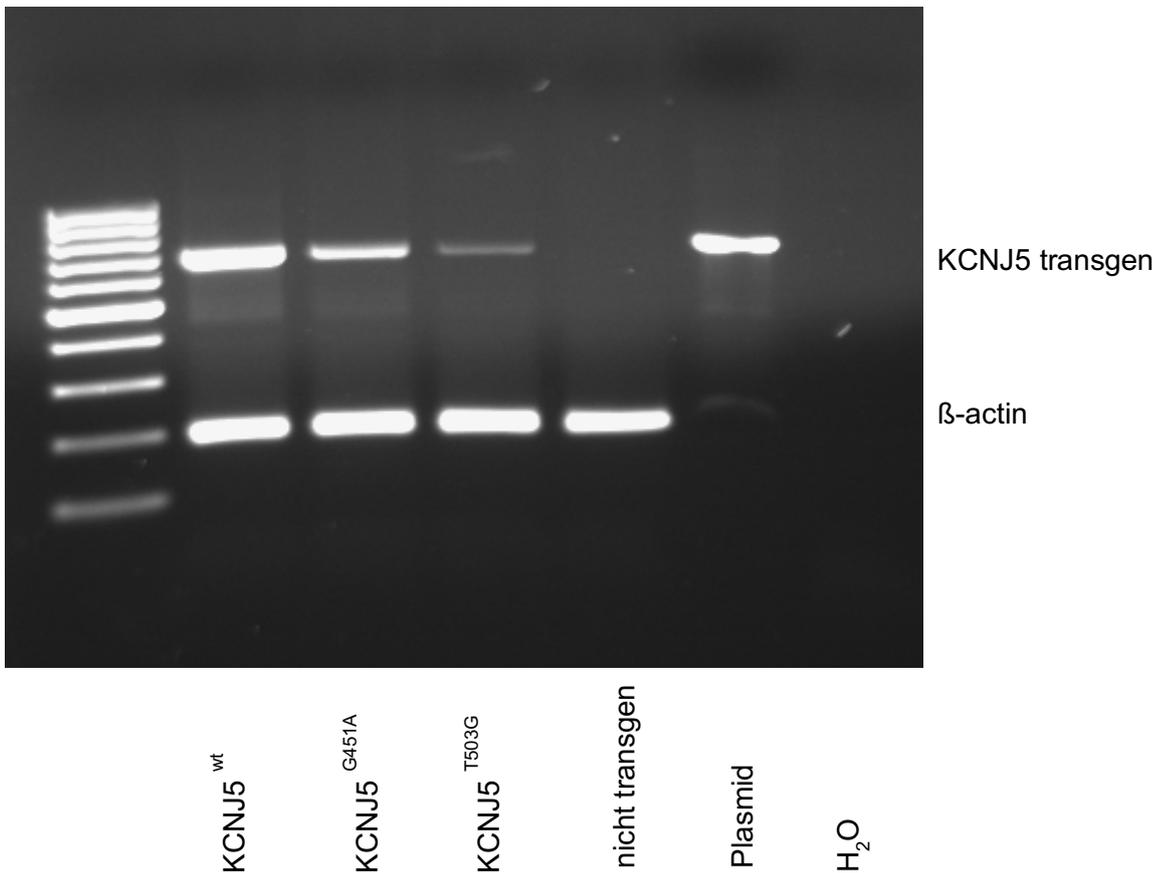


Abbildung 8: Genotypisierung via PCR und Gelelektrophorese. Aus Mausschwanz DNA lässt sich das Plasmid isolieren und Nachweisen. Nuklease freies Wasser dient als negativ Kontrolle, das Plasmid als positiv Kontrolle. β-actin als Nachweis intakter Maus DNA.

2.5 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau umfasste vier verschiedene Ansätze (Abbildung 9): Für alle Versuchsgruppen wurden jeweils heterozygote Tiere gezüchtet, d.h. transgene Tiere wurden mit nicht-transgenen Tieren verpaart. Die Genotypisierung erfolgte nach obigem Ablauf mittels DNA-Extraktion und Gelelektrophorese. Es wurden jeweils beide Geschlechter untersucht. Ziel war die Untersuchung von möglichen Effekten der transgenen *KCNJ5*-Expression unter Basalbedingungen in unterschiedlichen Altersgruppen, sowie unter funktioneller Testung. Dazu wurden die Tiere morphometrisch untersucht, die Aktivität der Enzyme der Steroidsynthese gemessen und die Menge von Aldosteron im Blut bestimmt. Exemplarisch wurden einzelne Nebennieren gefärbt, sowohl in einer einfachen HE-Färbung als auch mit Antikörpern gegen die Aldosteronsynthase und gegen *KCNJ5* selbst.

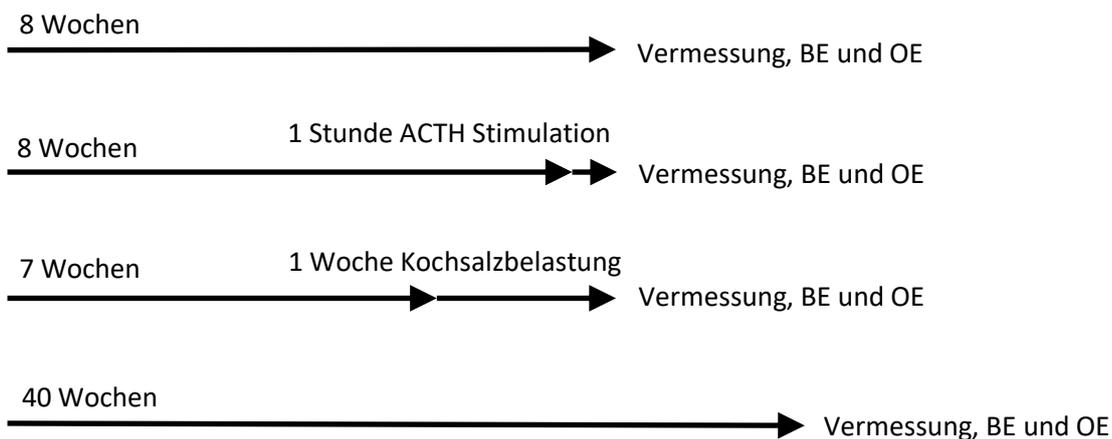


Abbildung 9: Schematische Skizzen der Versuchsansätze. Zur Untersuchung eines möglichen Kurzzeiteffekts wurden Tiere nach 8 Wochen vermessen, getötet, die Organe (OE) und das Trunk-Blood entnommen (BE). Zur funktionellen Testung geschah selbiges eine Woche nach intraperitonealer ACTH Injektion mit gleichaltrigen Tieren. In der dritten Versuchsgruppe waren Mäuse einer einwöchigen Kochsalzbelastung über Trinkwasser ausgesetzt und wurden ebenfalls mit 8 Wochen getötet. Zur Untersuchung eines möglichen Langzeiteffekts wurden Tiere im Alter nach selbem Schema im Alter von 40 Wochen untersucht.

2.6 Basale Phänotypisierung

Hierfür wurden *Wildtyp*, *KCNJ5^{wt}*, *KCNJ5^{G451A}* und *KCNJ5^{T503G}* Mäuse gezüchtet. Im Alter von 8 Wochen erfolgte die Gewichtsbestimmung, das Töten mittels capitaler Dislokation, die Entnahme von Trunk-Blood, Organentnahme und Vermessung, sowie im Anschluss die RNA-Extraktion und Charakterisierung der Mäuse bezüglich ihres Gehalts an Enzymen der

Steroidbiosynthese mittels Real-time-PCR. Entsprechende Untersuchungen wurden zudem an 40-Wochen alten Versuchstieren durchgeführt.

2.7 Funktionelle Testung

Nach 8 Wochen bekamen *Wildtyp*, *KCNJ5^{wt}*, *KCNJ5^{G451A}* und *KCNJ5^{T503G}* Tiere eine Stunde vor der Entnahme des Blutes und der Organe 1 µg Synacthen in 75 µl PBS intraperitoneal verabreicht. Die intraperitonealen Injektionen wurden jeweils vormittags zwischen 9 und 11 Uhr durchgeführt, um einen tageszeitabhängigen Einfluss auf die Messwerte möglichst zu vermeiden.

An einer weiteren Versuchsgruppe von Tieren wurde im Alter von 7 Wochen für 1 Woche eine kochsalzreiche Diät mit 4% Kochsalz im Trinkwasser verabreicht. Im Anschluss erfolgte erneut morgens und im Alter von 8 Wochen die Blut- und Organentnahme, sowie zur Bestimmung der morphometrischen Daten.

2.8 Versuchsdurchführung

2.8.1 Blut und Organentnahme

Die Mäuse wurden mit Isofluran betäubt und mittels zervikaler Dislokation getötet. Das Trunk-Blood wurde in einem Eppendorfgefäß aufgefangen, in welchem 10 µl EDTA 1mM vorgelegt wurde und auf Eis gekühlt. Später wurde das Blut bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und bei -20°C gelagert. Die Peritonealhöhle wurde mit einer Schere eröffnet, die Nebennieren jeweils unter einem Binokular mit Hilfe zweier Subkutannadeln von Fett und Bindegewebe freipräpariert. Zudem wurden beide Nieren und das Herz entnommen. Die Organe wurden in Eppendorfgefäße in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C verwahrt. Von insgesamt 14 Tieren wurde jeweils die linke Nebenniere in einer 4% PFA-Lösung eingelegt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Anzahl der Tiere deren Organe in Paraffin eingebettet wurden. Eingebettet wurden jeweils das Herz, beide Nieren, sowie die linke Nebenniere.

	<i>Wildtyp</i>	<i>KCNJ5^{wt}</i>	<i>KCNJ5^{G451A}</i>	<i>KCNJ5^{T503G}</i>
Weibchen 8 Wochen	4	1	1	
Männchen 8 Wochen	2	1	1	
Weibchen		2	1	

40 Wochen				
Männchen				1
40 Wochen				

2.8.2 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Um eine ausreichende Menge an mRNA zu erhalten wurden jeweils linke und rechte Nebenniere eines Tieres zusammengeführt. Die bei -80°C gelagerten Nebennieren wurden zuerst homogenisiert, dann mit Hilfe des Maxwell miRNA Tissue Kits nach Angaben des Herstellers bearbeitet. Der RNA-Gehalt der einzelnen Proben wurde mit dem NanoDrop bestimmt. Die so isolierte Einzelstrang-RNA wurde mit Hilfe einer Reversentranskriptase in komplementäre DNA (c-DNA) umgeschrieben.

2.8.3 Real-time PCR

Die Quantifizierung der mRNA-Level von Cyp11b2 (Aldosteronsynthase), Cyp11b1 (11 β -Hydroxylase), StAR (steroidogenic acute regulatory protein), Hsd3b1 (3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase), Scc (Cytochrom P450 Side Chain Cleavage Enzyme) und Kcnj5 erfolgte zusammen mit β -actin als housekeeping-Gen mit Hilfe des Mx3000P Stratagene qPCR Cycler und dem Fast EVA green qPCR Master Mix als Ansatz. Als Primer wurden dabei folgende Sequenzen verwendet:

Tabelle 9: Primersequenz, Annealingtemperatur und verwendetes Real-Time-PCR Programm.

Gen	Fwd/Rev	Primersequenz	Annealing-Temp °C	Programm
β-actin	Fwd Rev	ACCCGCGAGCACAGCTTCTT TCTGGGCCTCGTCACCCACATA	60°C	2-Step
Cyp11b2	Fwd Rev	CAGGGCCAAGAAAACCTACA ACGAGCATTTTGAAGCACCT	63°C	3-Step
Cyp11b1	Fwd Rev	GGTCGTCCACAGTCCTGGAGT ACCAACAGGATAGAGCCTCAAGGT	53°C	3-Step
StAR	Fwd Rev	GACCTTGAAAGGCTCAGGAAGAAC TAGCTGAAGATGGACAGACTTGC	60°C	3-Step
Hsd3b1	Fwd Rev	AAGGAGGAATTCTCCAAGCTG GAGCTGCAGAAGATGAAGGC	60°C	2-Step
Scc	Fwd Rev	AGGACTTTCCTGCGCT GCATCTCGGTAATGTTGG	63°C	3-Step
Kcnj5	Fwd Rev	AGCCAGCCCAAGAAGAGAG CTCCACGATGTGGGAGTTG	56°C	3-Step

Für die Realtime PCR nutzten wir entweder ein two- oder three-step Programm. Im Threestep-Programm erfolgte eine Präinkubation bei 95°C für 10 min, gefolgt von 35 Zyklen mit 15 sek. bei 95°C, der primerabhängigen Annealing Temperatur für 15 sek. sowie der Extension bei 72°C für 15 sek. Die Schmelzkurve wurde jeweils zwischen Annealing Temperatur und 95°C mit einem Temperaturanstieg von 0,1°C/sek. aufgezeichnet. Im twostep-Programm wurde der 72°C Schritt übersprungen.

2.8.4 Aldosteronbestimmung

Die Aldosteronbestimmung aus dem Serum des Trunk-Bloods erfolgte mittels direktem Sandwich ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay). Dazu wurde ein Protokoll der Arbeitsgruppe benutzt:

Zunächst erfolgte die Extraktion der Serumproben. Jeweils 50 µl der Proben, sowie der Kontrollen wurde in ein Glasröhrchen pipettiert. 2 ml Dichlormethan wurde unter dem Abzug zugegeben und anschließend gut gevortext. Die untere, klare, organische Phase wurde in ein neues Röhrchen gefüllt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel im Wasserbad verdampft.

Mikrotiterplatten wurden in zwei Schritten mit Anti-Maus-Antikörpern und darauffolgend Anti-Aldosteron-Antikörpern beschichtet. 50 µl der Proben wurden in Duplikaten auf die Mikrotiterplatten gegeben. Zur Detektion wurde ein in LKC-Puffer gelöster biotinylierter Aldosteron-Antikörper verwendet und hinzu pipettiert. Die Platten wurden eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert und anschließend über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am folgenden Tag wurden die Platten gewaschen. Zur Visualisierung wurde Streptavidin-Europium verwendet. Pro Well wurden 200 µl hinzupipettiert. Die Platte wurde mit Folie abgeklebt, 30 min auf dem Schüttler inkubiert und erneut gewaschen. Enhancement-Lösung wurde hinzugegeben, die Platten erneut für 15 min geschüttelt.

Die Auswertung des Assay erfolgte mit einem VICTOR Multilabel Plate Reader.

2.8.5 Morphologische Untersuchungen

Einzelne Nebennieren wurden histologisch untersucht. Insgesamt 14 Nebennieren wurden in Paraffin eingebettet (siehe Tabelle 8). Dafür wurden die Nebennieren direkt nach Organentnahme in eine 4% PFA-Lösung eingelegt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Einbettung wurden die Organe für jeweils 2 Stunden in Ethanollösungen in aufsteigender

Konzentration inkubiert, über 30%, 50%, 70%, 96% bis zu 100%. Im Anschluss erfolgte eine zweistündige Inkubation in Xylol und einem 1:1 Xylol-Paraffingemisch. Zuletzt wurden die Nebennieren in Paraffinblöcken eingelagert. So konserviert wurden an einem Rotationsmikrotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Auf Objektträger aufgezogen wurden sie über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur HE-Färbung mussten die Schnitte - analog zur Einbettung in Paraffin - durch Inkubation in Xylol und absteigender Ethanolreihe nach Protokoll der Arbeitsgruppe entparaffinisiert werden. Durch Färbung für 5 s mit Hämatoxylin und anschließender Spülung mit Leitungswasser erfolgte die Bläuung, gefolgt von einer Rötung mit angesäuertem Eosin Y für ebenfalls 5 s. Zur Dehydrierung wurden die Schnitte erneut in einer aufsteigenden Ethanolreihe und zuletzt Xylol inkubiert. Zuletzt wurden die Organe mit Permount Medium und einem Deckglas fixiert. Luftschlüsse wurden mit einer Pipettenspitze entfernt.

2.8.6 Immunhistochemie

Um mögliche Unterschiede in der Aldosteronproduktion der murinen Nebennieren visualisieren zu können, erfolgte die exemplarische Färbung mit einem Antikörper gegen die Aldosteronsynthase. Die Paraffinschnitte wurden durch Inkubation in Xylol und anschließend absteigender Ethanolreihe hydriert. Mit Hilfe von Tris-EDTA-Buffer, Kochen in der Mikrowelle und Spülen mit PBS erfolgte die Antigendemaskierung. Eine Hintergrundfärbung durch endogene Peroxidasen wurde mit einer 3%igen Wasserstoffperoxid-Methanollösung weitestgehend blockiert. Nach einstündiger Inkubation in Blocking-Puffer folgte die Behandlung mit dem Primärantikörper – α hCYP11B2 41 – und Inkubation bei 4°C über Nacht in einer Dampfkammer. Nach erneutem Waschen wurde der Sekundärantikörper hinzugefügt. Als Indikator wurde DAB verwendet. Nach Waschen in PBS erfolgte die Gegenfärbung mit Harris's Hämatoxylin. Als Differenzierungslösung verwendeten wir Ethanol-Salzsäure-Lösung. In aufsteigender Ethanolreihe wurden die Schnitte erneut dehydriert. Zuletzt wurden die Organe mit Permount Medium und Deckglas fixiert.

Um die Expression der KCNJ5-Kanäle selbst darstellen zu können, nützten wir einen Anti-KCNJ5-Antikörper. Analog zu den anderen Färbungen wurden die Schnitte entparaffinisiert. Nach Hydrierung wurden mit Hilfe von Citratpuffer die Epitope demaskiert. Durch Inkubation in 3%iger Wasserstoffperoxid-Methanollösung wurden Peroxidasen blockiert. Es erfolgte

die Behandlung mit Blockingpuffer und die Inkubation mit dem Primärantikörper – Anti-KCNJ5-Antikörper. Nach Sekundär- und Tertiärantikörper verwendeten wir erneut DAB als Indikator zur Visualisierung. Die Gegenfärbung erfolgte mit Methylengrün. Zur Dehydrierung wurden die Nebennierenschnitte in aufsteigenden Ethanolreihen eingelegt, zuletzt in Xylol. Abschließend wurden die IHC-Färbungen mit Deckmedium und Deckglas fixiert.

2.8.7 Statistische Auswertung

Die Erstellung der Graphiken, sowie die statistische Auswertung erfolgte mit Excel – Microsoft Office 2016. Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen wurden mit dem T-Test überprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % definiert. Signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden in den Graphiken mit * markiert, $p < 0,01$ mit ** und $p < 0,001$ mit ***. Wenn nicht anders angegeben wurden die unterschiedlichen Mauslinien jeweils mit *KCNJ5^{wt}* Tieren verglichen. Diese wurden zum vereinfachten Vergleich als Referenz – 100% – gesetzt. In den Graphiken ist der Mittelwert \pm Standardfehler in % eingezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Adrenale KCNJ5 Expression

Der erste Schritt in der Phänotypisierung eines transgenen KCNJ5-Mausmodells war der Nachweis der Expression des eingebrachten Plasmids in den Versuchstieren. Wir untersuchten daher zunächst die Expression von KCNJ5 auf mRNA Ebene bei jeweils 5 weiblichen Tieren jeder Mauslinie.

Hier konnte bei 8 Wochen alten Mäusen die erwartete deutliche Überexpression gegenüber *Wildtyp*-Tieren gezeigt werden. Alle drei transgenen Mauslinien exprimierten signifikant mehr KCNJ5 als nicht transgene *Wildtyp* Mäuse. *KCNJ5^{wt}* und *KCNJ5^{G451A}* Tiere scheinen zudem ein signifikant höheres KCNJ5 Expressionslevel als *KCNJ5^{T503G}* Mäuse zu erreichen (*Wildtyp* 100±20,0%; *KCNJ5^{wt}* 2615±959%, p=0,03; *KCNJ5^{G451A}* 3784±1386%, p=0,03; *KCNJ5^{T503G}* 341±60%, p=0,005; Abbildung 10 und Tabelle 10).

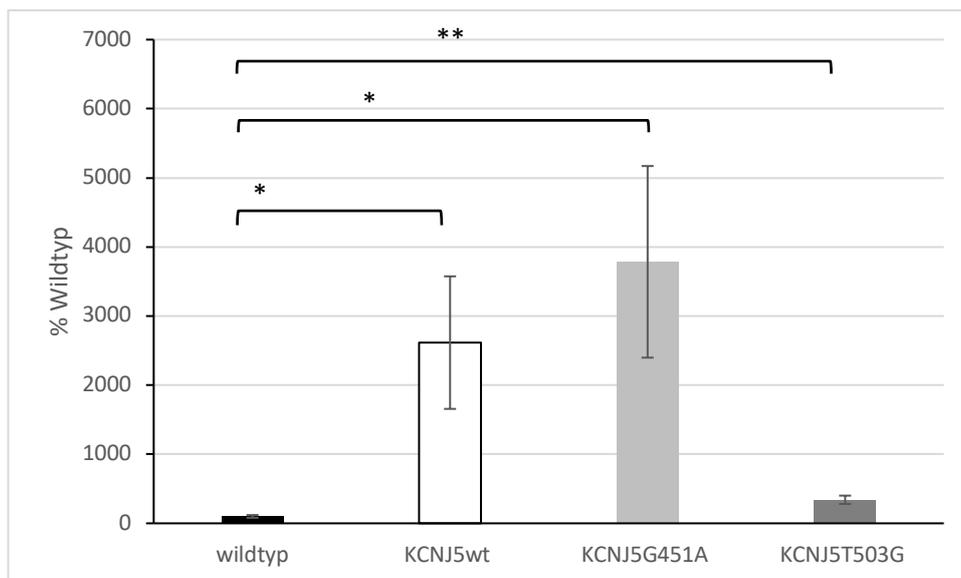


Abbildung 10: Ergebnisse der Real-time-PCR für *KCNJ5*- Expression. Jeweils fünf 8 Wochen alte Tiere Wildtyp, *KCNJ5^{wt}*, *KCNJ5^{G451A}* und *KNJ5^{T503G}* wurden auf ihre *KCNJ5* Expression hin untersucht. Wildtyp Tiere – Mäuse ohne inseriertes Plasmid – entsprechen 100%.

Tabelle 10: Ergebnisse der Real-time-PCR für *KCNJ5*- Expression. Jeweils fünf 8 Wochen alte Tiere Wildtyp, *KCNJ5^{wt}*, *KCNJ5^{G451A}* und *KNJ5^{T503G}* wurden auf ihre *KCNJ5* Expression hin untersucht

Anzahl der Tiere	Wildtyp	<i>KCNJ5^{wt}</i>	<i>KCNJ5^{G451A}</i>	<i>KCNJ5^{T503G}</i>
	5	5	5	5

T-Test	Wildtyp	<i>KCNJ5</i> ^{wt}	<i>KCNJ5</i> ^{G451A}	<i>KCNJ5</i> ^{T503G}
Gegen Wildtyp	1	0,03	0,03	0,005

	Wildtyp	<i>KCNJ5</i> ^{wt}	<i>KCNJ5</i> ^{G451A}	<i>KCNJ5</i> ^{T503G}
% von Wildtyp	100±20,0	2615±959	3784±1386	341±60

3.2 Maus – und Organgewichte

Das Körpergewicht, sowie das Gewicht der einzelnen Organe – Nebennieren rechts & links zusammengefasst, Herz, Nieren rechts & links zusammengefasst – wurde bestimmt. Untersucht wurden 8 Wochen alte Mäuse, 8 Wochen alte Tiere, die einer ACTH-Stimulation oder Kochsalzbelastung ausgesetzt waren, sowie 40 Wochen alte Mäuse unter Basalbedingungen. Bei den Weibchen fand sich für keine der Messgrößen, weder bei acht Wochen alten Tieren, bei 40 Wochen alten Tieren, nach ACTH-Stimulation, noch nach Kochsalzbelastung ein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen transgenen Tieren mit Mutation und *KCNJ5*^{wt} Mäusen innerhalb der einzelnen Versuchsarme (Tabelle 11). Um Gewichtszunahmen bzw. -abnahmen z.B. über die Zeit oder im Rahmen einer experimentellen Intervention darstellen zu können, berechneten wir die relativen Organgewichte bezogen auf das Körpergewicht. Hier sahen wir ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (vergleiche Abbildung 11).

Tabelle 11: Körper- und Organgewicht, Weibchen. Bestimmt und verglichen wurden alle Genotypen und Versuchsarme.

Maus-Gewicht [g]

Weibchen	8 Wochen	8 Wochen NaCl	8 Wochen ACTH	40 Wochen
wildtyp	18,1±0,4			
<i>KCNJ5</i> ^{wt}	18,5±0,6	14,0±0,3	19,4±0,4	26,2±0,5
<i>KCNJ5</i> ^{G451A}	18,7±0,8	13,9±0,5	19,5±0,2	28,8±1,5
<i>KCNJ5</i> ^{T503G}	19,4±0,7	14,1±0,5	19,7±0,3	25,9±0,9

Nebennieren-Gewicht [mg]

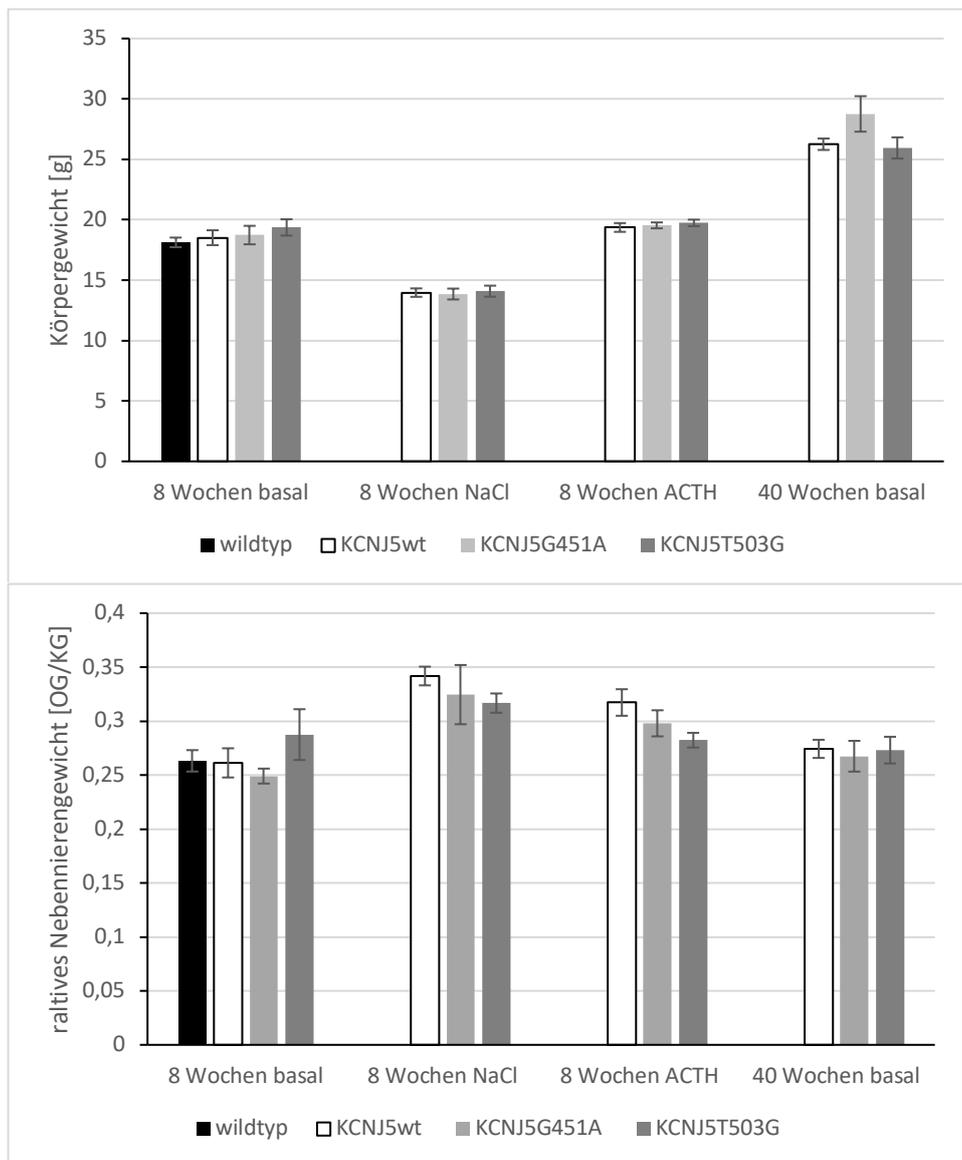
Weibchen	8 Wochen	8 Wochen NaCl	8 Wochen ACTH	40 Wochen
wildtyp	4,8±0,2			
<i>KCNJ5</i> ^{wt}	4,8±0,2	4,8±0,1	6,1±0,2	7,2±0,2
<i>KCNJ5</i> ^{G451A}	4,7±0,2	4,5±0,3	5,8±0,2	7,6±0,4
<i>KCNJ5</i> ^{T503G}	5,5±0,5	4,4±0,1	5,6±0,2	6,9±0,3

Herz-Gewicht [mg]

Weibchen	8 Wochen	8 Wochen NaCl	8 Wochen ACTH	40 Wochen
wildtyp	101,4±3,4			
KCNJ5wt	107,7±5,5	84,7±5,2	100,5±4,6	136,6±3,9
KCNJ5G451A	109,3±4,6	95,1±9,4	96,9±2,2	137,8±6,0
KCNJ5T503G	117,7±6,8	91,4±5,6	104,3±3,2	131,7±6,4

Nieren-Gewicht [mg]

Weibchen	8 Wochen	8 Wochen NaCl	8 Wochen ACTH	40 Wochen
wildtyp	200,7±5			
KCNJ5wt	216,6±5	212,8±3	227,8±10	338,5±7
KCNJ5G451A	203,8±11	200,0±4	234,1±5	330,8±19
KCNJ5T503G	235,4±12	205,4±6	228,6±6	330,7±12



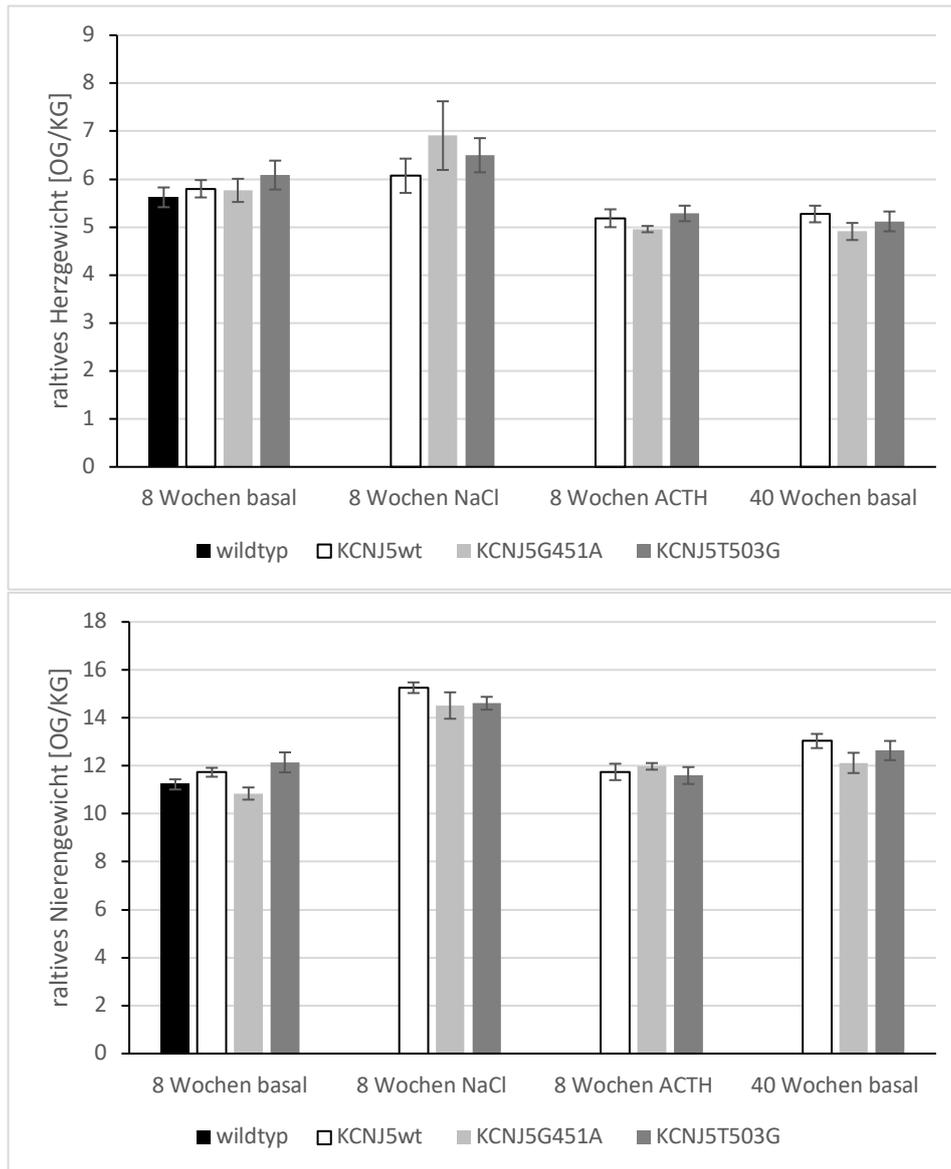


Abbildung 11: Körper- und relatives Organgewicht, der weiblichen Tiere. Bestimmt und verglichen wurden alle Genotypen und Versuchsarme. Die Organgewichte wurden als relatives Organgewicht dargestellt (Organgewicht [mg]/Körpergewicht [g]).

Das Körper-Gewicht der weiblichen Mäuse, die einer Kochsalzbelastung ausgesetzt waren, war verglichen mit acht Wochen alten Tieren ohne Exposition signifikant erniedrigt (8 Wochen ohne NaCl $18,6 \pm 0,3$ g vs. mit NaCl $14,0 \pm 0,2$ g, $p=3,25766E-14$). Auch die einzelnen Organe scheinen nach Kochsalzbelastung leichter zu sein. Ein signifikanter Unterschied fand sich für das Herzgewicht (8 Wochen ohne NaCl Belastung $108,2 \pm 2,5$ mg vs. mit NaCl $90,4 \pm 3,9$ mg, $p=0,00025$), was sich nach Bezugnahme auf das Körpergewicht wiederum ausglich. Das Gewicht der Nebennieren und Nieren unterschied sich nicht signifikant (Tabelle 12).

Tabelle 12: Vergleich von Maus- und Organgewichten von 8-Wochen alten Tieren mit und ohne Kochsalzbelastung. Getestet und miteinander verglichen wurden jeweils Tiere desselben Genotyps.

T-Test 8-Wochen vs. NaCl	Mausgewicht	Nebennieren	Herz	Nieren
KCNJ5wt	7,8848E-05	0,88	0,012	0,59
KCNJ5G451A	0,00040127	0,57	0,165	0,80
KCNJ5T503G	2,8174E-05	0,06	0,012	0,05
Alle	3,2577E-14	0,09	0,00025	0,14

Bei 8 Wochen alten Männchen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppen. Nach einwöchiger Kochsalzbelastung war das Gewicht der Nebennieren sowohl bei *KCNJ5^{G451A}* als auch bei *KCNJ5^{T503G}* Tieren signifikant höher als das Gewicht der Nebennieren der *KCNJ5^{wt}* Gruppe (*KCNJ5^{wt}* 3,5±0,1mg; *KCNJ5^{G451A}* 4,6±0,2mg, p=0,001; *KCNJ5^{T503G}* 4,0±0,1mg, p=0,001). Zudem waren sowohl *KCNJ5^{G451A}* als auch *KCNJ5^{T503G}* Tiere nach Kochsalzbelastung signifikant schwerer als *KCNJ5^{wt}* Mäuse (*KCNJ5^{wt}* 16,0±0,8g, *KCNJ5^{G451A}* 19,2±0,9g, p=0,03; *KCNJ5^{T503G}* 18,4±0,6g, p=0,04). Ebenfalls schwerer waren 40 Wochen alte *KCNJ5^{G451A}* Männchen verglichen mit *KCNJ5^{wt}* Mäusen (*KCNJ5^{wt}* 29,7±0,7g; *KCNJ5^{G451A}* 32,6±0,7g, p=0,01) (Abbildung 12 und Tabelle 13).

Auch hier wurden die relativen Organgewichte berechnet, um Gewichtszunahmen bzw. Abnahmen z.B. über die Zeit oder im Rahmen einer experimentellen Intervention darstellen zu können. Bei 8 und 40 Wochen alten Männchen, sowie nach ACTH-Stimulation waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Bei Mäusen, die einer einwöchigen Kochsalzbelastung ausgesetzt waren, waren die Nieren von transgenen Tieren mit Mutation bezogen auf das Körpergewicht signifikant leichter als die der Mäuse ohne Mutation (*KCNJ5^{wt}* 14,9±0,2, *KCNJ5^{G451A}* 13,9±0,2, p=0,001; *KCNJ5^{T503G}* 13,8±0,3, p=0,03) (vergleiche Abbildung 12).

Tabelle 13: Körper und Gewicht der Organe, Männchen. Bestimmt und verglichen wurden alle Genotypen und Versuchsarme.

Maus-Gewicht [g]				
Mittelwert	8 Wochen	8 Wochen NaCl	8 Wochen ACTH	40 Wochen
wildtyp	21,8±1,0			
KCNJ5wt	21,9±1,1	16,0±0,8	24,0±0,8	29,7±0,7
KCNJ5G451A	23,6±1,3	19,2±0,9		32,6±0,7
KCNJ5T503G	22,0±0,6	18,4±0,6	23,1±1,0	31,4±0,7

Nebennieren-Gewicht [mg]

Mittelwert	8 Wochen	8 Wochen NaCl	8 Wochen ACTH	40 Wochen
wildtyp	3,8±0,2			
KCNJ5wt	3,3±0,2	3,5±0,1	4,3±0,2	3,2±0,3
KCNJ5G451A	3,9±0,4	4,6±0,2		3,2±0,3
KCNJ5T503G	3,9±0,3	4,0±0,1	4,0±0,2	3,3±0,4

Herz-Gewicht [mg]

Mittelwert	8 Wochen	8 Wochen NaCl	8 Wochen ACTH	40 Wochen
wildtyp	124,5±7,9			
KCNJ5wt	115,2±6,4	98,1±6,3	125,3±6,6	154,7±6,2
KCNJ5G451A	126,5±6,6	119,6±9,3		162,6±6,2
KCNJ5T503G	130,3±4,1	114,1±5,6	131,5±13,4	158,5±7,1

Nieren-Gewicht [mg]

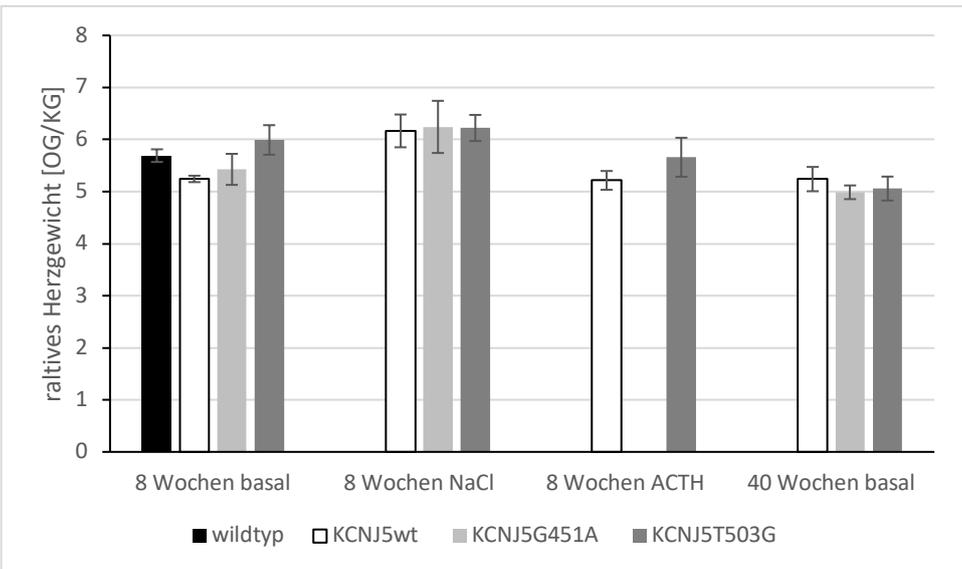
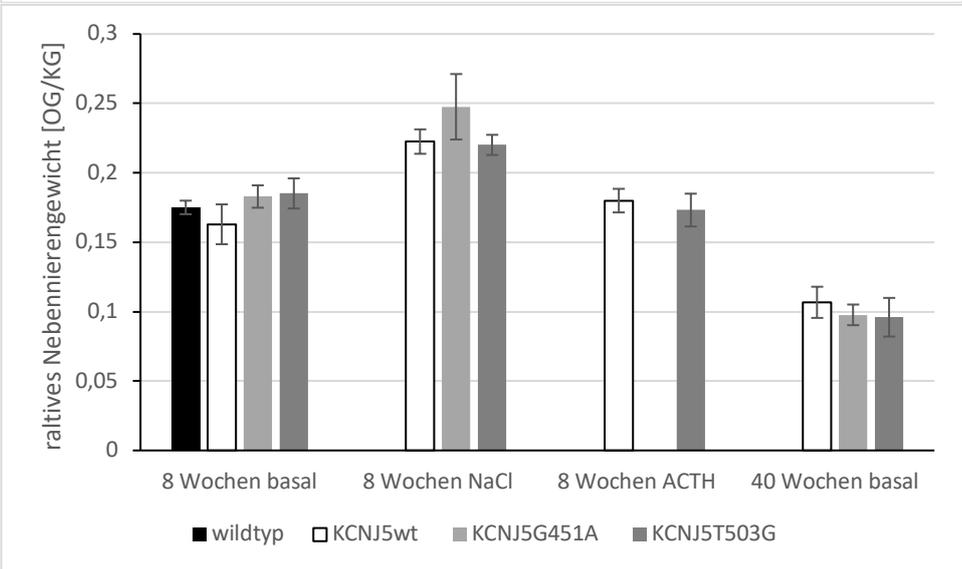
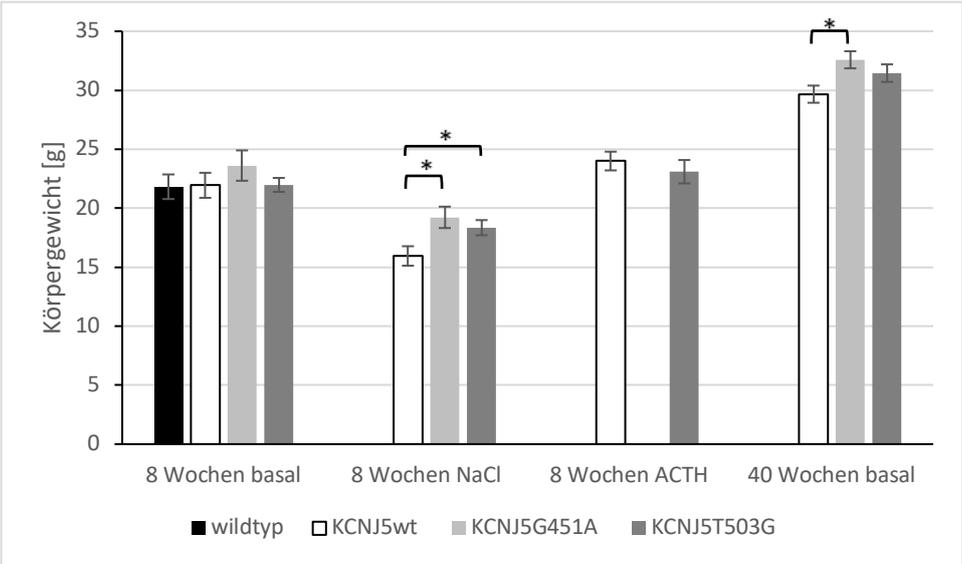
Mittelwert	8 Wochen	8 Wochen NaCl	8 Wochen ACTH	40 Wochen
wildtyp	261,3±6,8			
KCNJ5wt	260,5±10,0	238,5±15,1	309,3±8,7	376,1±18,6
KCNJ5G451A	275,3±13,6	267,2±10,5		411,8±15,9
KCNJ5T503G	280,4±10,4	253,0±6,6	296,5±23,7	405,3±12,9

T-Test 40 Wochen

Männchen	Mausgewicht	Nebennieren	Herz	Nieren	N=
KCNJ5wt					11
KCNJ5G451A	0,011	0,31	0,38	0,68	10
KCNJ5T503G	0,102	0,51	0,69	0,65	11

T-Test NaCl

Männchen	Mausgewicht	Nebennieren	Herz	Nieren	N=
KCNJ5wt					6
KCNJ5G451A	0,03	0,001	0,08	0,17	4
KCNJ5T503G	0,04	0,001	0,08	0,35	8



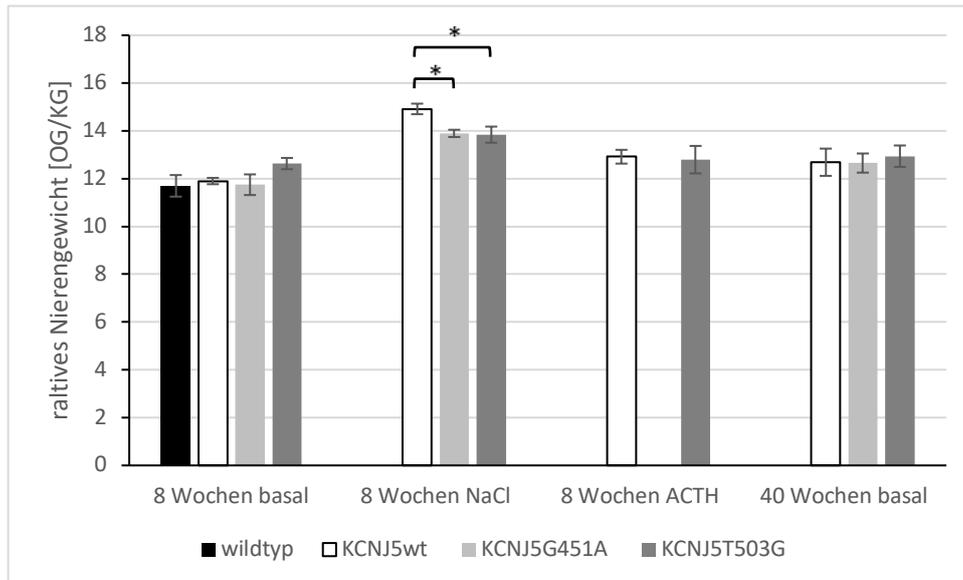


Abbildung 12: Körper- und Organgewicht der männlichen Tiere. Bestimmt und verglichen wurden alle Genotypen und Versuchsarme. Die Organgewichte wurden als relatives Organgewicht dargestellt (Organgewicht [mg]/Körpergewicht [g]).

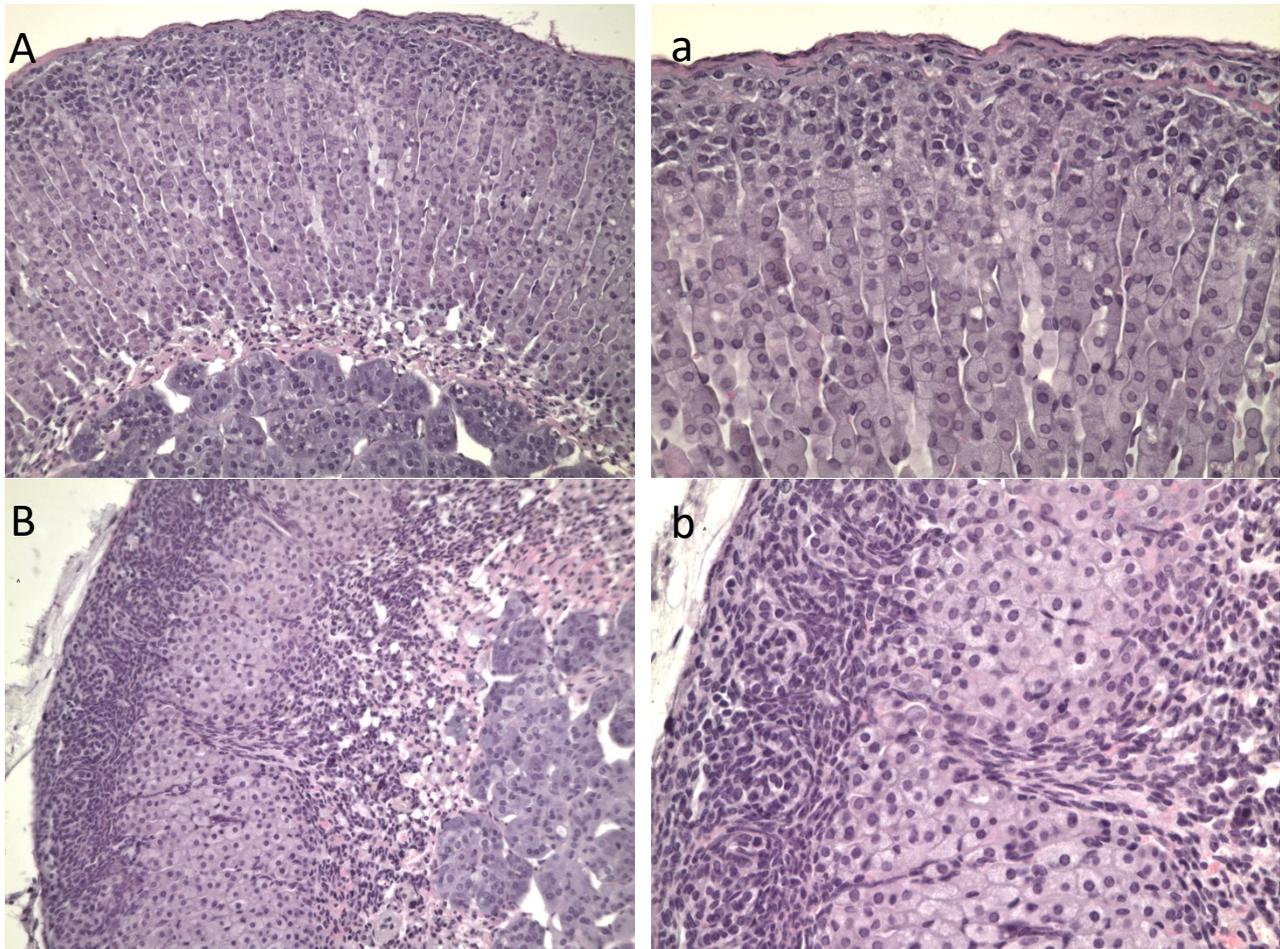
Wie bei den Weibchen war auch das Gewicht der Männchen nach einwöchiger Kochsalzbelastung verglichen mit 8 Wochen alten Tieren ohne Exposition signifikant reduziert (8 Wochen ohne NaCl $22,4 \pm 0,5$ g vs. mit NaCl $17,7 \pm 0,5$ g, $p < 0,001$). Auch das Herzgewicht war nach Kochsalzbelastung signifikant niedriger (8 Wochen ohne NaCl $125,8 \pm 2,9$ mg vs. $110,0 \pm 4,2$ mg, $p = 0,003$). Zudem scheinen nach NaCl-Belastung die Nieren signifikant leichter zu sein (8 Wochen ohne NaCl $273,1 \pm 6,8$ mg vs. mit NaCl $252,2 \pm 6,3$ mg, $p = 0,02$) (Tabelle 14)

Tabelle 14: Vergleich von Maus- und Organgewichten von 8-Wochen alten Tieren mit und ohne Kochsalzbelastung. Getestet und miteinander verglichen wurden jeweils Tiere desselben Genotyps.

T-Test 8-Wochen vs. NaCl	Mausgewicht	Nebennieren	Herz	Nieren
KCNJ5wt	0,001	0,30	0,091	0,28
KCNJ5G451A	0,049	0,30	0,561	0,68
KCNJ5T503G	0,001	0,70	0,027	0,06
Alle	1,1955E-07	0,30	0,003	0,02

3.3 Morphologie und Zonierung der Nebenniere

Um einen Überblick über die Morphologie, sowie die zonale Expression von KCNJ5 und Cyp11b2 zu erhalten erfolgten exemplarische Färbungen. Hierfür nutzten wir Hämatoxylin-Eosin (Abbildung 13), einen KCNJ5-Antikörper (Abbildung 14), sowie einen Antikörper gegen die Aldosteronsynthese (Abbildung 15). Eine qualitative oder quantitative Analyse war auf Grund der geringen Anzahl verfügbarer Gewebe nicht möglich.



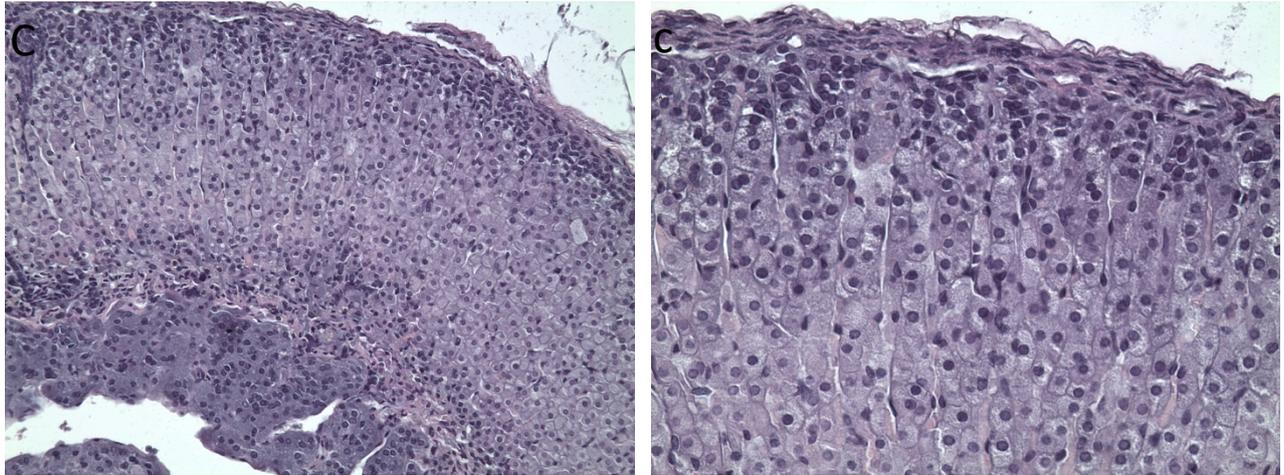


Abbildung 13: exemplarische HE Färbung von 8 Wochen alten KCNJ5wt (A, a), KCNJ5G451A (B, b), KCNJ5T503G (C, c) Tieren in Vergrößerung von 200x links und 400x rechts

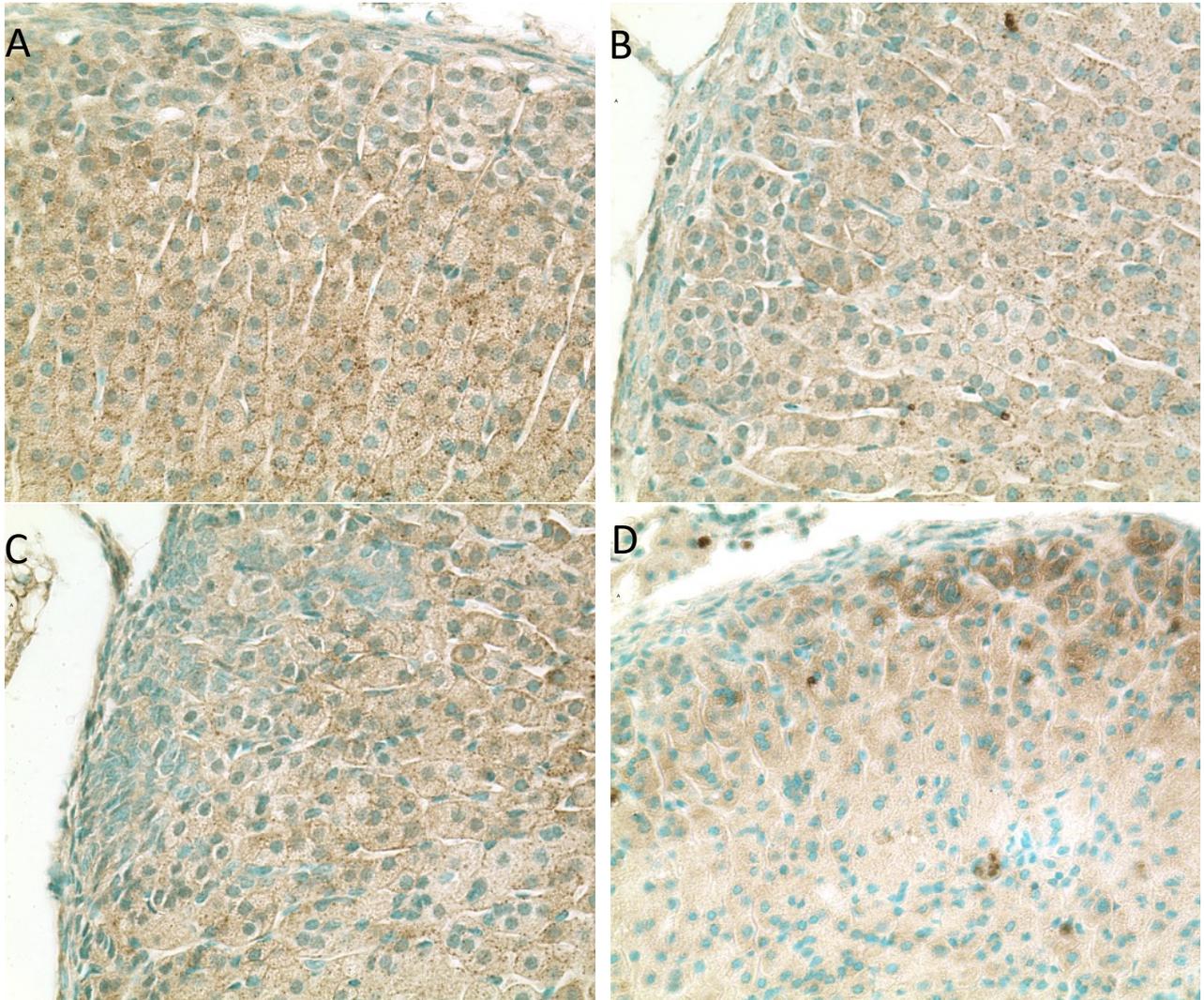


Abbildung 14: exemplarische Färbung mit KCNJ5 Antikörper von 8 Wochen alten Wildtyp (A), KCNJ5wt (B), KCNJ5G451A (C), KCNJ5T503G (D) Tieren in der 400x Vergrößerung. Die Gegenfärbung mit Methylengrün.

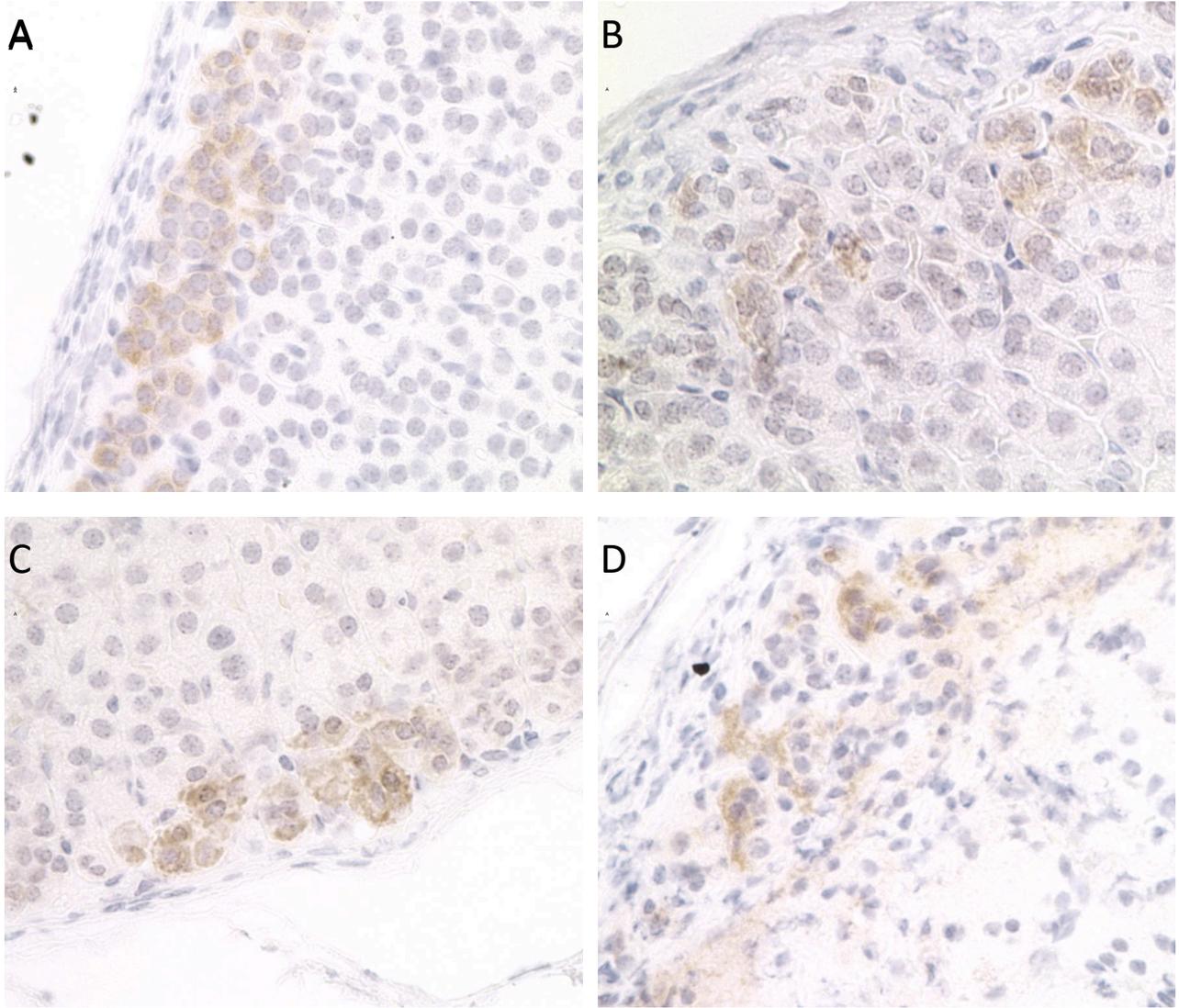


Abbildung 15: exemplarische Färbung der Aldosteronsynthese von 8 Wochen alten Wildtyp (A), KCNJ5wt (B), KCNJ5T503G (C), KCNJ5G451A (D) Tieren in der 800x Vergrößerung.

3.4 Expression von Enzymen der Steroidbiosynthese

Um zu überprüfen, ob das Transgen einen Einfluss auf die Expression der Enzyme der Steroidbiosynthese hat, untersuchten wir die Nebennieren der unterschiedlichen Mausgruppen auf ihre Expression von Cyp11b2, Cyp11b1, StAR, Scc und Hsd3b1.

3.4.1 Basaler Phänotyp nach 8 Wochen

Bei weiblichen Tieren sahen wir zwischen *Wildtyp* und *KCNJ5^{wt}* Mäusen keinen signifikanten Unterschied in der mRNA-Expression für eines der untersuchten Enzyme (*KCNJ5^{wt}*: Cyp11b2 100±15,3%, p=1; Cyp11b1 100±5,4%, p=1; StAR 100±11,1%, p=1; Scc 100±7,1%, p=1; Hsd3b1 100±1,8%, p=1; *wildtyp*: Cyp11b2 89,4±18,5%, p=0,68; Cyp11b1 119,4±7,2%, p=0,06; StAR 107,9±9,2%, p=0,59; Scc 128,0±13,4%, p=0,11; Hsd3b1 113,7±8,8%, p=0,19). *KCNJ5^{G451A}* Tiere zeigten hingegen eine signifikant höhere Expression von Cyp11b1, StAR, Scc und Hsd3b1 (Cyp11b1 184,6±16,1%, p=0,0004; StAR 158,6±8,8%, p=0,001; Scc 167,8±15,7%, p=0,003; Hsd3b1 161,3±13,9%, p=0,001). Auch für Cyp11b2 war ein klarer Trend in Richtung erhöhter Expression auffällig (Cyp11b2 154,4±19,7%, p=0,057). Bei *KCNJ5^{T503G}* Tieren war lediglich eine Signifikanz für Cyp11b2, Cyp11b1 und Hsd3b1 messbar (Cyp11b2 151,8±14,6%, p=0,028; Cyp11b1 133,5±9,1, p=0,007; Hsd3b1 124,1±9,9%, p=0,031). Bezüglich der Expressionslevels von StAR, sowie Scc gab es keine Unterschiede (StAR 97,3±13,5%, p=0,880; Scc 124,5±12,8%, p=0,118) (Abbildung 16 und Tabelle 15).

Bei 8 Wochen alten Männchen sahen wir in der Real-Time-PCR zwischen *Wildtyp* und *KCNJ5^{wt}* Mäusen keinen signifikanten Unterschied in der mRNA-Expression für eines der getesteten Enzyme (*KCNJ5^{wt}*: Cyp11b2 100±6,2%, p=1; Cyp11b1 100±6,4%, p=1; StAR 100±8,4%, p=1; Scc 100±7,1%, p=1; Hsd3b1 100±7,4%, p=1; *wildtyp*: Cyp11b2 142,3±23,7%, p=0,13; Cyp11b1 108,0±3,7%, p=0,31; StAR 115,4±15,4%, p=0,41; Scc 120,9±6,7%, p=0,08; Hsd3b1 116,9±2,9%, p=0,10). Sowohl *KCNJ5^{G451A}*, als auch *KCNJ5^{T503G}* Tiere zeigten eine signifikant niedrigere Expression von Scc (*KCNJ5^{G451A}* 41,6±3,6%, p=0,00001; *KCNJ5^{T503G}* 72,0±5,5%, p=0,004). StAR war in der *KCNJ5^{T503G}* Gruppe signifikant überexprimiert. Diesen Unterschied sahen wir bei *KCNJ5^{G451A}* Tieren nicht (*KCNJ5^{T503G}* 137,3±5,8%, p=0,02; *KCNJ5^{G451A}* 105,8±13,0%,

p=0,74). Bezüglich des Cyp11b2, Cyp11b1 sowie Hsd3b1 Expressionsleveln fanden sich zwischen den unterschiedlichen Mausgruppen keine signifikanten Abweichungen (Cyp11b2: *KCNJ5*^{wt} Cyp11b2 100±6,2%, p=1; *KCNJ5*^{G451A} 121,5±13,4%, p=0,26; *KCNJ5*^{T503G} 127,0±12,7%, p=0,17; Cyp11b1: *KCNJ5*^{wt} 100±6,4%, p=1; *KCNJ5*^{G451A} 110,1±6,7%, p=0,34; *KCNJ5*^{T503G} 116,6±7,1%, p=0,16; Hsd3b1: *KCNJ5*^{wt} 100±7,4%, p=1; *KCNJ5*^{G451A} 95,5±7,1%, p=0,68; *KCNJ5*^{T503G} 108,2±6,0%, p=0,66) (Abbildung 17 und Tabelle 16).

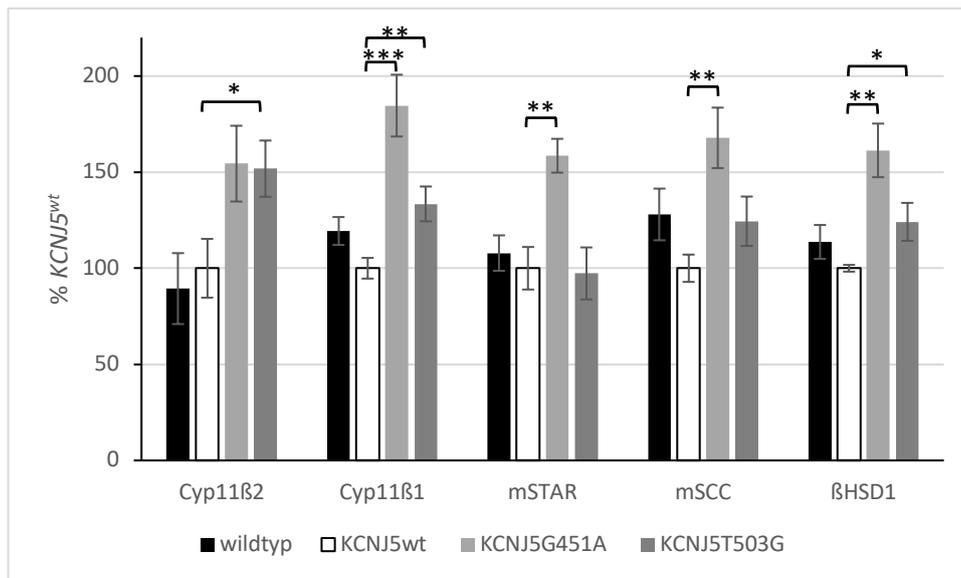


Abbildung 16: Vergleich der Expression der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme zwischen den verschiedenen Genotypen bei 8 Wochen alten Weibchen

Tabelle 15: Vergleich der Expression der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme zwischen den verschiedenen Genotypen bei 8 Wochen alten Weibchen. N entspricht Anzahl der Tiere. Referenz sind *KCNJ5*^{wildtyp} Weibchen.

% of <i>KCNJ5</i> ^{wt}	Cyp11b2	Cyp11b1	StAR	ScC	Hsd3b1	N=
<i>wildtyp</i>	89,4±18,5	119,4±7,2	107,9±9,2	128,0±13,4	113,7±8,8	10
<i>KCNJ5</i> ^{wt}	100±15,3	100±5,4	100±11,1	100±7,1	100±1,8	8
<i>KCNJ5</i> ^{G451A}	154,4±19,7	184,6±16,1	158,6±8,8	167,8±15,7	161,3±13,9	9
<i>KCNJ5</i> ^{T503G}	151,8±14,6	133,5±9,1	97,3±13,5	124,5±12,8	124,1±9,9	8

T-Test	Cyp11b2	Cyp11b1	StAR	ScC	Hsd3b1
<i>wildtyp</i>	0,675	0,057	0,589	0,107	0,192
<i>KCNJ5</i> ^{wt}					
<i>KCNJ5</i> ^{G451A}	0,057	0,0004	0,001	0,003	0,001
<i>KCNJ5</i> ^{T503G}	0,028	0,007	0,880	0,118	0,031

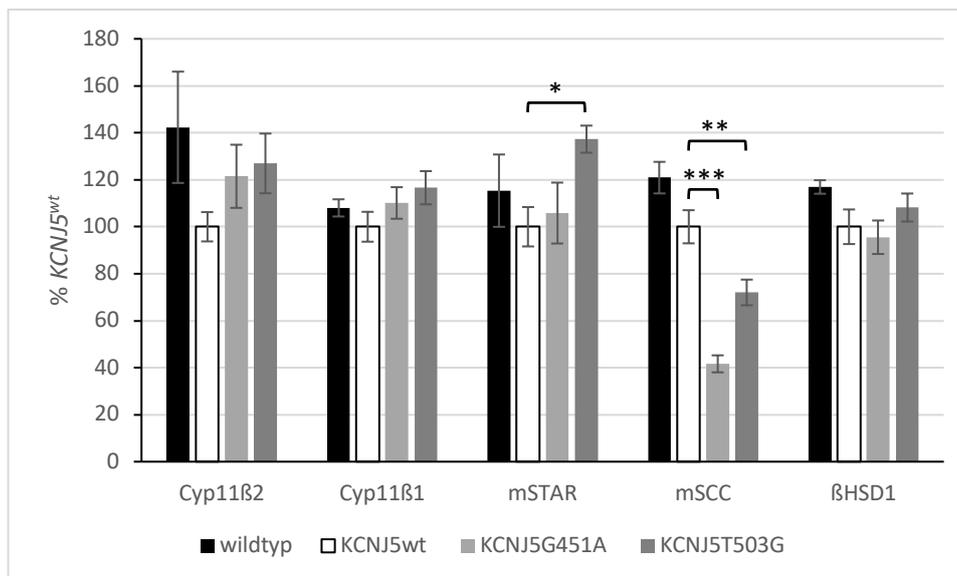


Abbildung 17: Vergleich der Expression der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme zwischen den verschiedenen Genotypen bei 8 Wochen alten Männchen.

Tabelle 16: Vergleich der Expression der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme zwischen den verschiedenen Genotypen bei 8 Wochen alten Männchen. N entspricht der Anzahl der getesteten Tiere. Referenz sind *KCNJ5^{wildtyp}* Männchen.

	Cyp11b2	Cyp11b1	StAR	ScC	Hsd3b1	N=
Wildtyp	142,3±23,7	108,0±3,7	115,4±15,4	120,9±6,7	116,9±2,9	5
KCNJ5^{wt}	100±6,2	100±6,4	100±8,4	100±7,1	100±7,4	5
KCNJ5^{G451A}	121,5±13,4	110,1±6,7	105,8±13,0	41,6±3,6	95,5±7,1	7
KCNJ5^{T503G}	127,0±12,7	116,6±7,1	137,3±5,8	72,0±5,5	108,2±6,0	12

T-Test	Cyp11b2	Cyp11b1	StAR	ScC	Hsd3b1
Wildtyp	0,125	0,306	0,406	0,084	0,096
KCNJ5^{wt}					
KCNJ5^{G451A}	0,260	0,340	0,740	1,4413E-05	0,680
KCNJ5^{T503G}	0,166	0,165	0,020	0,004	0,664

3.4.2 Basaler Phänotyp nach 40 Wochen

Cyp11b2 war bei weiblichen 40- Wochen alten *KCNJ5^{G451A}* Tieren grenzwertig nicht signifikant erhöht. *KCNJ5^{T503G}* Weibchen zeigten hingegen im Vergleich zu *KCNJ5^{wt}* Tieren eine Signifikanz (*KCNJ5^{wt}* 100±16,9%, p=1; *KCNJ5^{G451A}* 166,0±29,8%, p=0,05; *KCNJ5^{T503G}* 179,1±20,8%, p= 0,009). Eine gesteigerte Expression von ScC war bei *KCNJ5^{G451A}* Tieren auffällig (*KCNJ5^{wt}* 100±17,4%, p=1; *KCNJ5^{G451A}* 165,3±22,3%, p=0,04). Diese sahen wir in der *KCNJ5^{T503G}* Gruppe nicht (*KCNJ5^{T503G}* 125,1±11,1%, p=0,25). Eine signifikant geringere

Menge an c-DNA von Cyp11b1, StAR und Hsd3b1 konnte sowohl bei *KCNJ5^{G451A}*, als auch *KCNJ5^{T503G}* Tieren detektiert werden (Cyp11b1: *KCNJ5^{wt}* 100±9,9%, p=1; *KCNJ5^{G451A}* 27,7±3,2%, p=0,00008; *KCNJ5^{T503G}* 31,5±6,0%, p=0,00002; StAR: *KCNJ5^{wt}* 100±13,1%, p=1; *KCNJ5^{G451A}* 25,9±2,5%, p=0,0007; *KCNJ5^{T503G}* 27,5±4,3%, p=0,0001; Hsd3b1 *KCNJ5^{wt}* 100±13,1%, p=1; *KCNJ5^{G451A}* 17,0±2,6%, p=0,0003; *KCNJ5^{T503G}* 25,6±5,2%, p=0,0001) (Abbildung 18 und Tabelle 16).

In der Real-Time-PCR sahen wir bei 40 Wochen alten Männchen eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression von StAR, sowohl bei *KCNJ5^{G451A}* Tieren, als auch der *KCNJ5^{T503G}* Gruppe (*KCNJ5^{wt}* 100±4,5%, p=1; *KCNJ5^{G451A}* 140,1±11,0%, p=0,003; *KCNJ5^{T503G}* 122,3±7,2%, p=0,02). Für Cyp11b2, Cyp11b1, Scc und Hsd3b1 ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Mauslinien nachweisen (Cyp11b2: *KCNJ5^{wt}* 100±9,8%, p=1; *KCNJ5^{G451A}* 124,4±14,8%, p=0,18; *KCNJ5^{T503G}* 119,6±13,7%, p=0,27; Cyp11b1: *KCNJ5^{wt}* 100±7,9%, p=1; *KCNJ5^{G451A}* 100,7±8,4%, p=0,96; *KCNJ5^{T503G}* 95,4±5,4%, p=0,63; Scc: *KCNJ5^{wt}* 100±5,2%, p=1; *KCNJ5^{G451A}* 103,5±6,0%, p=0,67; *KCNJ5^{T503G}* 112,5±6,1%, p=0,14; Hsd3b1: *KCNJ5^{wt}* 100±5,7%, p=1; *KCNJ5^{G451A}* 109,6±9,3%, p=0,38; *KCNJ5^{T503G}* 94,2±4,2%, p=0,42) (Abbildung 19 und Tabelle 18).

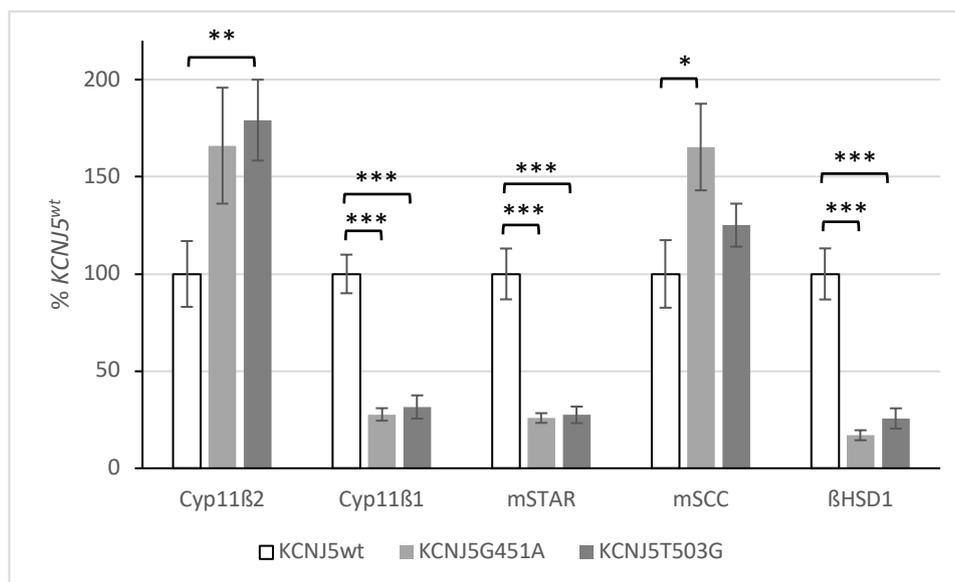


Abbildung 18: Vergleich der Expression der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme zwischen den verschiedenen Genotypen bei 40 Wochen alten Weibchen.

Tabelle 17: Vergleich der Expression der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme zwischen den verschiedenen Genotypen bei 40 Wochen alten Weibchen. N entspricht der Anzahl der getesteten Tiere. Referenz sind *KCNJ5^{wildtyp}* Weibchen.

	Cyp11b2	Cyp11b1	StAR	ScC	Hsd3b1	N=
<i>KCNJ5^{wt}</i>	100±16,9	100±9,9	100±13,1	100±17,4	100±13,1	10
<i>KCNJ5^{G451A}</i>	166,0±29,8	27,7±3,2	25,9±2,5	165,3±22,3	17,0±2,6	6
<i>KCNJ5^{T503G}</i>	179,1±20,8	31,5±6,0	27,5±4,3	125,1±11,1	25,6±5,2	9

T-Test	Cyp11b2	Cyp11b1	StAR	ScC	Hsd3b1
<i>KCNJ5^{wt}</i>					
<i>KCNJ5^{G451A}</i>	0,05	8,2979E-05	0,0007	0,037	0,0003
<i>KCNJ5^{T503G}</i>	0,009	2,3914E-05	0,0001	0,252	0,0001

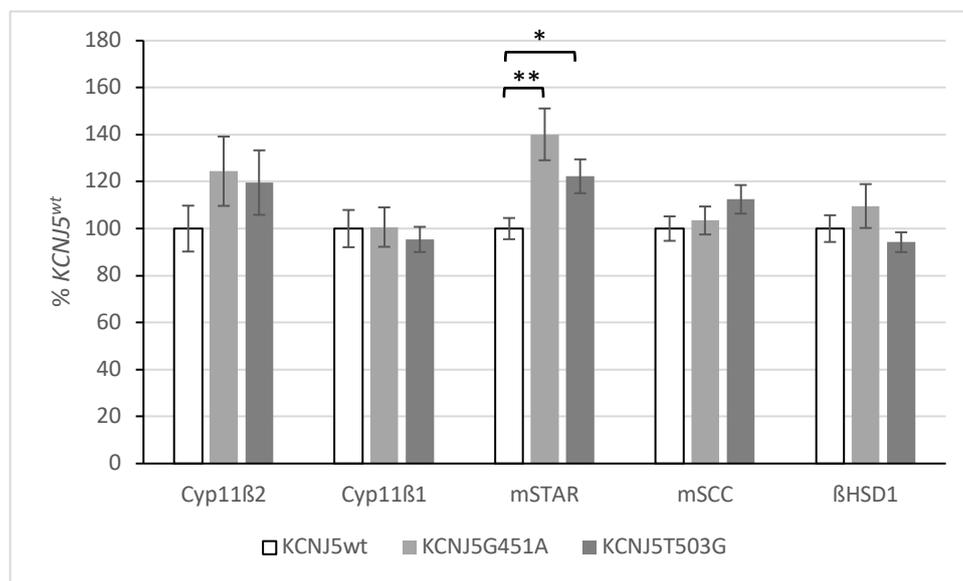


Abbildung 19: Vergleich der Expression der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme zwischen den verschiedenen Genotypen bei 40 Wochen alten Männchen. N entspricht der Anzahl der getesteten Tiere. Referenz sind *KCNJ5^{wildtyp}* Männchen.

Tabelle 18: Vergleich der Expression der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme zwischen den verschiedenen Genotypen bei 40 Wochen alten Männchen. N entspricht der Anzahl der getesteten Tiere. Referenz sind *KCNJ5^{wildtyp}* Männchen.

	Cyp11b2	Cyp11b1	StAR	ScC	Hsd3b1	N=
<i>KCNJ5^{wt}</i>	100±9,8	100±7,9	100±4,5	100±5,2	100±5,7	9
<i>KCNJ5^{G451A}</i>	124,4±14,8	100,7±8,4	140,1±11,0	103,5±6,0	109,6±9,3	8
<i>KCNJ5^{T503G}</i>	119,6±13,7	95,4±5,4	122,3±7,2	112,5±6,1	94,2±4,2	10

T-Test	Cyp11b2	Cyp11b1	StAR	ScC	Hsd3b1
<i>KCNJ5^{wt}</i>					
<i>KCNJ5^{G451A}</i>	0,17880756	0,95573544	0,00313874	0,66748171	0,38201455
<i>KCNJ5^{T503G}</i>	0,27074733	0,62927633	0,02058285	0,14246797	0,41902354

3.4.3 Kochsalzbelastungs-Test

Die Mausgruppen im Versuchsarm Kochsalzbelastung erhielten eine Woche lang kochsalzhaltiges Trinkwasser ad libitum. Auch hier erfolgte die Testung auf mRNA-Gehalt der Enzyme der Steroidbiosynthese mittels real-time-PCR. Unter diesen Testbedingungen war die Cyp11b2 mRNA-Expression von weiblichen *KCNJ5^{G451A}* und *KCNJ5^{T503G}* Tieren verglichen mit weiblichen *KCNJ5^{wt}* Mäusen signifikant erhöht (Cyp11b2: *KCNJ5^{wt}* 100±6,6%, p=1; *KCNJ5^{G451A}* 210,2±51,5%, p=0,044; *KCNJ5^{T503G}* 309,0±38,5%, p=0,0004). In der *KCNJ5^{T503G}* Gruppe sahen wir zudem Scc vermehrt exprimiert (*KCNJ5^{wt}* 100±7,3%, p=1; *KCNJ5^{T503G}* 182,5±9,1%, p=0,011). Bei *KCNJ5^{G451A}* Tieren war der gemessene Unterschied für Scc nicht signifikant (*KCNJ5^{G451A}* 133,1±17,9%, p=0,118). Für die übrigen Enzyme Cyp11b1, StAR und Hsd3b1 ließ sich ebenso keine Signifikanz für eine der Mauslinien nachweisen (*KCNJ5^{wt}*: Cyp11b1 100±5,2%, p=1; StAR 100±6,9%, p=1; Hsd3b1 100±7,4%, p=1; *KCNJ5^{G451A}*: Cyp11b1 96,4±12,8%, p=0,802; StAR 100,0±11,8%, p=0,999; Hsd3b1 94,8±2,4%, p=0,516; *KCNJ5^{T503G}*: Cyp11b1 90,9±25,0%, p=0,749; StAR 90,2±26,3%, p=0,367; Hsd3b1 95,6±22,8%, p=0,868) (Abbildung 20 und Tabelle 19).

Nach einer Woche Kochsalzbelastung zeigten männliche *KCNJ5^{T503G}* Tiere in der Real-Time-PCR eine Überexpression von Cyp11b2 und Scc (Cyp11b2 445,2±80,8%, p=0,007; Scc 581,6±176,6%, p=0,02). In der *KCNJ5^{G451A}* Gruppe war der Unterschied in der Cyp11b2 Expression knapp nicht signifikant (373,3±133,3%, p=0,057). Scc wurde von *KCNJ5^{G451A}* Männchen ebenfalls vermehrt synthetisiert (581,6±176,6%, p=0,018). Diese Überexpressionen waren in ähnlicher Weise auch bei den Weibchen nachweisbar. Das Expressionslevel von Cyp11b1, StAR und Hsd3b1 war bei allen männlichen Mauslinien verglichen mit *KCNJ5^{wt}* Tieren signifikant erniedrigt (Cyp11b1: *KCNJ5^{wt}* 100±12,1%, p=1; *KCNJ5^{G451A}* 38,1±6,1%, p=0,004; *KCNJ5^{T503G}* 43,4±11,9%, p=0,009; StAR: *KCNJ5^{wt}* 100±11,4%, p=1; *KCNJ5^{G451A}* 32,5±7,0%, p=0,002; *KCNJ5^{T503G}* 39,2±10,9%, p=0,004; Hsd3b1: *KCNJ5^{wt}* 100±19,9%, p=1; *KCNJ5^{G451A}* 19,7±7,2%, p=0,011; *KCNJ5^{T503G}* 30,5±11,1%, p=0,007). Hier war bei den Weibchen kein Unterschied detektierbar (Abbildung 21 und Tabelle 20).

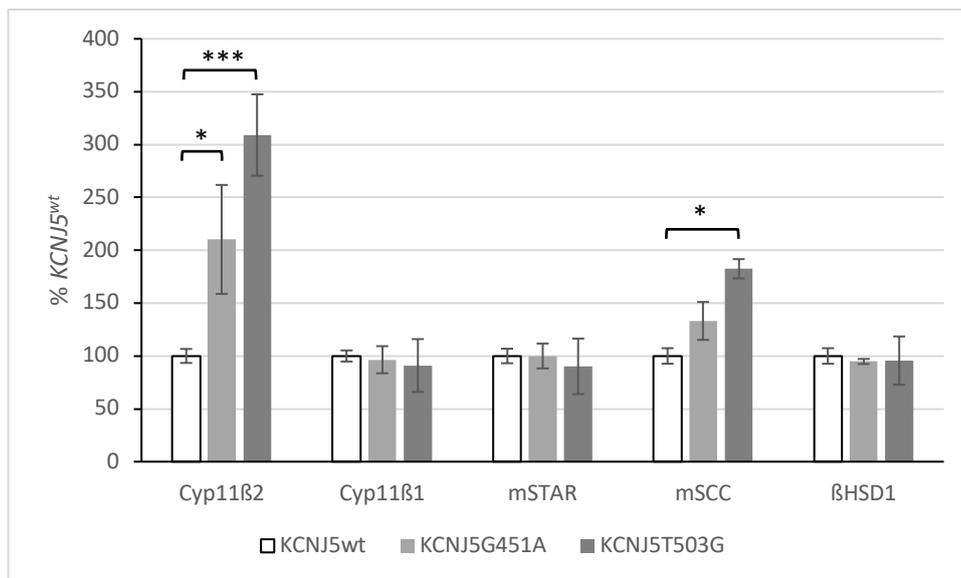


Abbildung 20: Vergleich der Expression der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme zwischen den verschiedenen Genotypen bei 8 Wochen alten Weibchen nach einwöchiger Kochsalzbelastung.

Tabelle 19: Vergleich der Expression der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme zwischen den verschiedenen Genotypen bei 8 Wochen alten Weibchen nach einwöchiger Kochsalzbelastung. N entspricht der Anzahl der getesteten Tiere. Referenz sind *KCNJ5*^{wildtyp} Weibchen.

	Cyp11b2	Cyp11b1	StAR	ScC	Hsd3b1	N=
<i>KCNJ5</i> ^{wt}	100±6,6	100±5,2	100±6,9	100±7,3	100±7,4	6
<i>KCNJ5</i> ^{G451A}	210,2±51,5	96,4±12,8	100,0±11,8	133,1±17,9	94,8±2,4	6
<i>KCNJ5</i> ^{T503G}	309,0±38,5	90,9±25,0	90,2±26,3	182,5±9,1	95,6±22,8	7

T-Test	Cyp11b2	Cyp11b1	StAR	ScC	Hsd3b1
<i>KCNJ5</i> ^{wt}					
<i>KCNJ5</i> ^{G451A}	0,044	0,802	0,999	0,118	0,516
<i>KCNJ5</i> ^{T503G}	0,0004	0,749	0,367	0,011	0,868

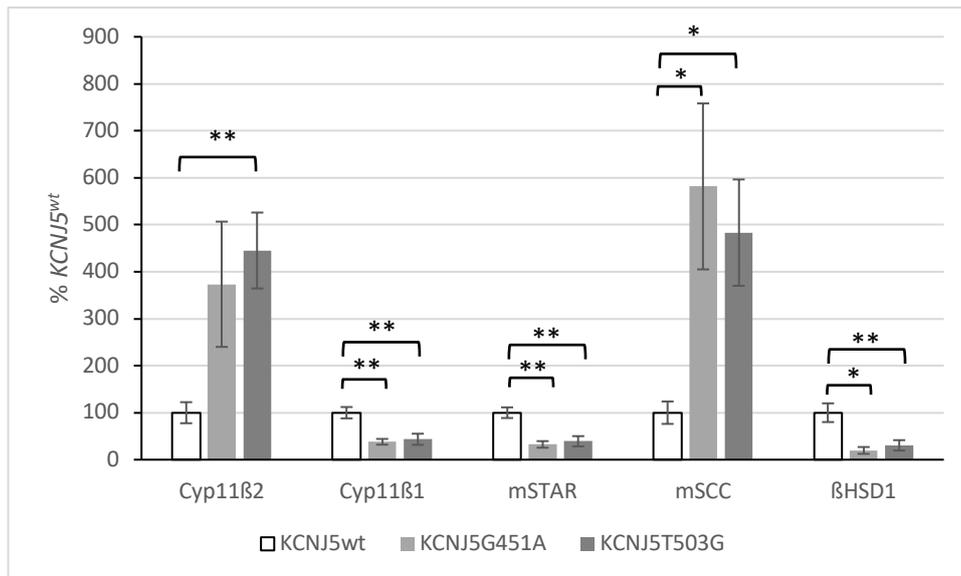


Abbildung 21: Vergleich der Expression der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme zwischen den verschiedenen Genotypen bei 8 Wochen alten Männchen nach einwöchiger Kochsalzbelastung. N entspricht der Anzahl der getesteten Tiere. Referenz sind *KCNJ5*^{wildtyp} Männchen.

Tabelle 20: Vergleich der Expression der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme zwischen den verschiedenen Genotypen bei 8 Wochen alten Männchen nach einwöchiger Kochsalzbelastung. N entspricht der Anzahl der getesteten Tiere. Referenz sind *KCNJ5*^{wildtyp} Männchen.

	Cyp11b2	Cyp11b1	StAR	Scc	Hsd3b1	N=
<i>KCNJ5</i> ^{wt}	100±22,4	100±12,1	100±11,4	100±23,9	100±19,9	5
<i>KCNJ5</i> ^{G451A}	373,3±133,3	38,1±6,1	32,5±7,0	581,6±176,6	19,7±7,2	4
<i>KCNJ5</i> ^{T503G}	445,2±80,8	43,4±11,9	39,2±10,9	483,3±113,1	30,5±11,1	8

T-Test	Cyp11b2	Cyp11b1	StAR	Scc	Hsd3b1
<i>KCNJ5</i> ^{wt}					
<i>KCNJ5</i> ^{G451A}	0,057	0,004	0,002	0,018	0,011
<i>KCNJ5</i> ^{T503G}	0,007	0,009	0,004	0,024	0,007

3.4.4 ACTH Stimulations-Test

Eine Stunde nach ACTH Stimulation fand sich bei weiblichen *KCNJ5*^{G451A} und *KCNJ5*^{T503G} Tieren ein signifikant reduzierter Cyp11b2 mRNA-Gehalt verglichen mit *KCNJ5*^{wt} Mäusen (Cyp11b2: *KCNJ5*^{wt} 100±12,9%, p=1; *KCNJ5*^{G451A} 44,4±8,4%, p=0,007; *KCNJ5*^{T503G} 53,3±4,3%, p=0,002). Die Expressionslevel für Cyp11b1, StAR und Hsd3b1 waren für beide Linien verglichen mit dem c-DNA Gehalt von *KCNJ5*^{wt} Mäusen signifikant erhöht (*KCNJ5*^{wt}: Cyp11b1 100±14,2%, p=1; StAR 100±11,8%, p=1; Hsd3b1 100±12,3%, p=1; *KCNJ5*^{G451A}: Cyp11b1 193,1±19,2%, p=0,003; StAR 172,8±9,7%, p=0,001; Hsd3b1 254,8±25,5%,

p=0,0003; *KCNJ5*^{T503G}: Cyp11b1 216,3±21,5%, p=0,001; StAR 157,8±11,5%, p=0,004; Hsd3b1 263,4±35,1%, p=0,002). Für Scc fand sich kein wesentlicher Unterschied (*KCNJ5*^{wt} 100±13,5%, p=1; *KCNJ5*^{G451A} 88,1±6,5%, p=0,47; *KCNJ5*^{T503G} 75,1±4,7%, p=0,09) (Abbildung 22 und Tabelle 21).

Eine Stunde nach ACTH Injektion fand sich bei Männchen in der Real-Time-PCR kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression von Cyp11b2 bei *KCNJ5*^{T503G} Tieren verglichen mit *KCNJ5*^{wt} Mäusen (*KCNJ5*^{wt} 100±12,7%, p=1; *KCNJ5*^{T503G} 112,7±34,3%, p=0,70). Bei jeweils kleiner Gruppengröße und großer Streubreite sahen wir einen Trend in Richtung gesteigerter Expression bei *KCNJ5*^{T503G} Männchen der Enzyme Cyp11b1, StAR und Hsd3b1 (Cyp11b1: *KCNJ5*^{wt} 100±19,0%, p=1; *KCNJ5*^{T503G} 691,6±335,2%, p=0,056; StAR: *KCNJ5*^{wt} 100±11,1%, p=1; *KCNJ5*^{T503G} 832,7±415%, p=0,06; Hsd3b1: *KCNJ5*^{wt} 100±17,5%, p=1; *KCNJ5*^{T503G} 2585,0±1433%, p=0,06). *KCNJ5*^{T503G} Tiere zeigten einen Trend hin zu einem niedrigeren Scc-Gehalt (*KCNJ5*^{wt} 100±7,7%, p=1; *KCNJ5*^{T503G} 48,9±26,1%, p=0,06) (Abbildung 23 und Tabelle 22).

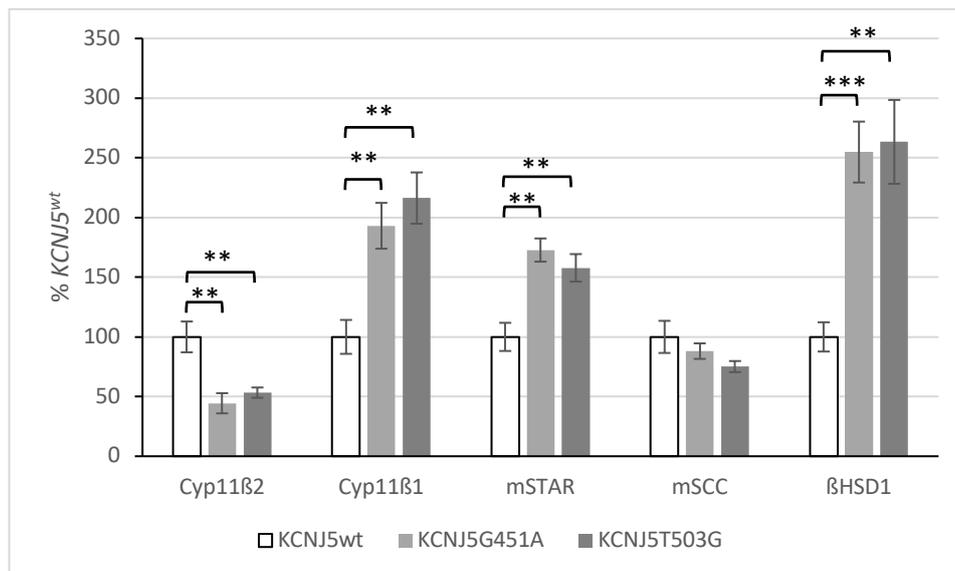


Abbildung 22: Vergleich der Expression der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme zwischen den verschiedenen Genotypen bei 8 Wochen alten Weibchen nach ACTH Stimulation.

Tabelle 21: Vergleich der Expression der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme zwischen den verschiedenen Genotypen bei 8 Wochen alten Weibchen nach ACTH Stimulation. N entspricht Anzahl der Tiere. Referenz sind *KCNJ5*^{wildtyp} Weibchen.

	Cyp11b2	Cyp11b1	StAR	Scc	Hsd3b1	N=
<i>KCNJ5</i> ^{wt}	100±12,9	100±14,2	100±11,8	100±13,5	100±12,3	6
<i>KCNJ5</i> ^{G451A}	44,4±8,4	193,1±19,2	172,8±9,7	88,1±6,5	254,8±25,5	5
<i>KCNJ5</i> ^{T503G}	53,3±4,3	216,3±21,5	157,8±11,5	75,1±4,7	263,4±35,1	8

T-Test	Cyp11b2	Cyp11b1	StAR	ScC	Hsd3b1
KCNJ5^{wt}					
KCNJ5^{G451A}	0,007	0,003	0,001	0,47	0,0003
KCNJ5^{T503G}	0,002	0,001	0,004	0,09	0,002

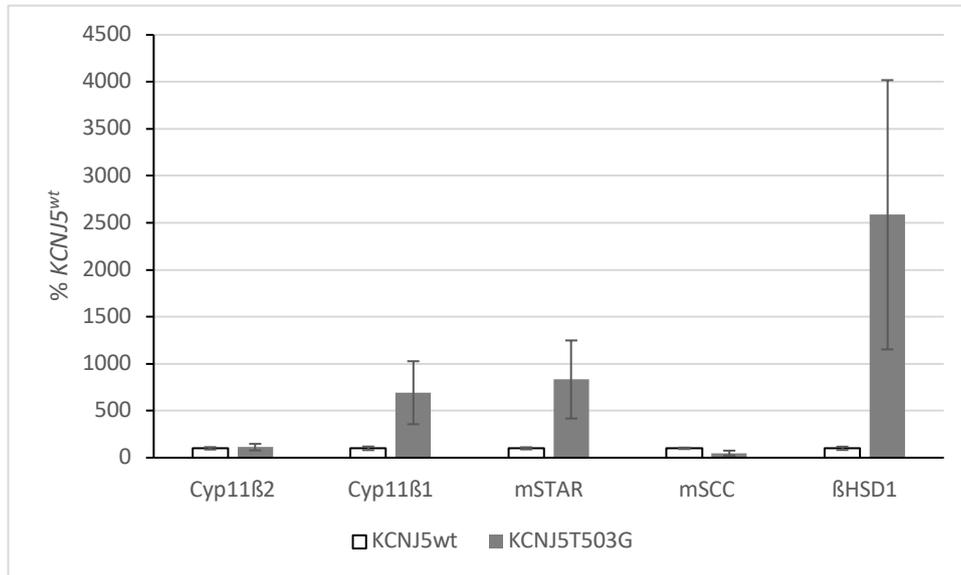


Abbildung 23: Vergleich der Expression der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme zwischen den verschiedenen Genotypen bei 8 Wochen alten Männchen nach ACTH Stimulation.

Tabelle 22: Vergleich der Expression der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme zwischen den verschiedenen Genotypen bei 8 Wochen alten Männchen nach ACTH Stimulation. N entspricht der Anzahl der getesteten Tiere. Referenz sind *KCNJ5^{wildtyp}* Männchen.

	Cyp11b2	Cyp11b1	StAR	ScC	Hsd3b1	N=
KCNJ5^{wt}	100±12,7	100±19,0	100±11,1	100±7,7	100±17,5	6
KCNJ5^{T503G}	112,7±34,3	691,6±335,2	832,7±415	48,9±26,1	2585,0±1433	4

T-Test	Cyp11b2	Cyp11b1	StAR	ScC	Hsd3b1
KCNJ5^{wt}					
KCNJ5^{T503G}	0,697	0,0568	0,056	0,055	0,060

3.5 Plasmaaldosteronkonzentration

Der Aldosteron-Spiegel im Blut 8 Wochen alter Tiere wurde bestimmt. Bei den Männchen fand sich kein signifikanter Unterschied in der Konzentration von Aldosteron verglichen mit *KCNJ5^{wt}* Mäusen (*Wildtyp* 343,4±70,5 pg/ml, p=0,20; *KCNJ5^{wt}* 530,5±113,0 pg/ml, p=1,0; *KCNJ5^{G451A}* 566,6±68,4 pg/ml, p=0,78; *KCNJ5^{T503G}* 437,3±79,9 pg/ml, p=0,53). Auch bei den Weibchen ließ sich kein signifikanter Unterschied im Aldosteron-Gehalt des Bluts feststellen (*Wildtyp* 598,2±133,1 pg/ml, p=0,21; *KCNJ5^{wt}* 392,7±47,2 pg/ml, p=1,0; *KCNJ5^{G451A}* 506,5±106,5 pg/ml, p=0,38; *KCNJ5^{T503G}* 628,5±139,4 pg/ml, p=0,13) (Abbildung 24 und Tabelle 23).

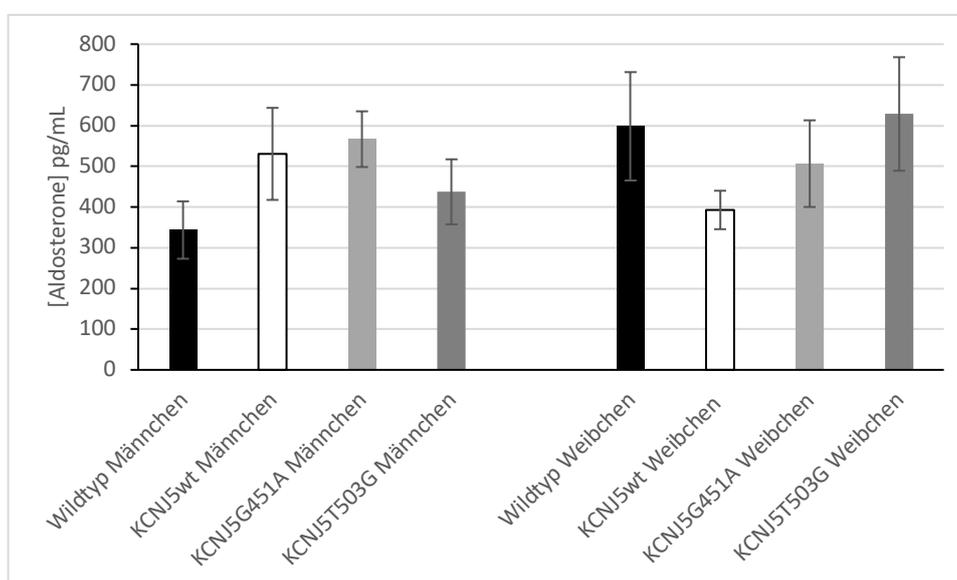


Abbildung 24: Vergleich der Aldosteronlevel im Blut von 8 Wochen alten Tieren - Weibchen und Männchen - der unterschiedlichen Genotypen.

Tabelle 23: Vergleich der Aldosteronlevel im Blut von 8 Wochen alten Tieren - Weibchen und Männchen - der unterschiedlichen Genotypen. Absolutzahlen in pg/ml.

Anzahl der Tiere	Wildtyp	<i>KCNJ5^{wt}</i>	<i>KCNJ5^{G451A}</i>	<i>KCNJ5^{T503G}</i>
Weibchen 8 Wochen	10	8	10	8
Männchen 8 Wochen	5	5	8	12

T-Test	Wildtyp	<i>KCNJ5^{wt}</i>	<i>KCNJ5^{G451A}</i>	<i>KCNJ5^{T503G}</i>
Weibchen 8 Wochen	0,21	1	0,38	0,13
Männchen 8 Wochen	0,20	1	0,78	0,53

Aldosteron [pg/mL]	Wildtyp	<i>KCNJ5^{wt}</i>	<i>KCNJ5^{G451A}</i>	<i>KCNJ5^{T503G}</i>
Weibchen 8 Wochen	598,2±133,1	392,7±47,2	506,5±106,5	628,5±139,4
Männchen 8 Wochen	343,4±70,5	530,5±113,0	566,6±68,4	437,3±79,9

4. Diskussion und Einordnung der Ergebnisse

Als wichtigste endokrine Ursache einer Hypertonie gilt der primäre Hyperaldosteronismus. In etwa einem Drittel aller Aldosteron-produzierender Adenome konnten Mutationen im und in der Nähe des Selektivitätsfilters des Kaliumkanals KCNJ5 gefunden werden. Dabei sind mit ca. 20 bzw. 14%, G451A und T503G die führenden Mutationen (53; 58).

Das langfristige Ziel des Projekts war die Generierung neuartiger, bislang nicht verfügbarer *in vivo* Modelle mit nebennierenspezifischer Überexpression des Kaliumkanals KCNJ5. Dafür wurde das KCNJ5-Gen bzw. seine Mutanten unter die Kontrolle des *akr1b7*-Promotors gesetzt, um eine Nebennierenrinden-spezifische Expression des Transgens zu erreichen (65).

Ziel der Arbeit war der Nachweis des eingebrachten Plasmids, der Nachweis und die Quantifizierung von KCNJ5-cDNA, die Darstellung möglicher Unterschiede zwischen den Geschlechtern, sowie die Untersuchung von möglichen Kurzzeiteffekten, sowie eine funktionelle Testung und die Erfassung von Langzeiteffekten im *in vivo* Modell.

4.1 Adrenale KCNJ5 Expression

KCNJ5 mRNA konnte in den Nebennieren transgener Tiere detektiert werden. Wie zu erwarten synthetisierten *Wildtyp* Tiere keine KCNJ5-RNA, während die mit Abstand größte Menge in der real-time-PCR von 8-Wochen alten *KCNJ5*^{G451A} Mäusen gemessen werden konnte. Eigentlich wäre eine ähnlich hohe Promotoraktivität und somit kein signifikanter Unterschied in der Expression von KCNJ5 in der real-time-PCR zwischen den verschiedenen transgenen Gruppen zu erwarten gewesen. Ein toxischer Effekt des inserierten Transgens mit konsekutivem Zelluntergang und daraus resultierend geringerer Expression von KCNJ5 könnte als Erklärungsansatz dienen. Die Bedeutung der verschiedenen KCNJ5-Hotspot-Mutationen auf die Proliferation und Apoptose von adrenergen Zellen wurde von einer Arbeitsgruppe der LMU-München untersucht (66). Hierfür wurden Nebennieren nach Resektion von 72 Patienten mit unilateralem primären Hyperaldosteronismus sequenziert. Dabei konnte in 16 Fällen eine G151R (entspricht c.G451A) und in 22 Fällen eine L168R (entspricht c.T503G) Mutation nachgewiesen werden, sowie einmalig eine T158A Mutation. Die restlichen

Mutationen betrafen nicht das KCNJ5-Gen (CACNA1D, ATP1A1, ATP2B3). Während KCNJ5-T158A zu einer Proliferation von Nebennierenrindenzellen führte, stimulierten die beiden Mutationen aus unserem Plasmid die Apoptose. Des Weiteren exprimierten Cyp11b2 positive Zellen in Adenomen mit KCNJ5 Mutation deutlich weniger KCNJ5 als Cyp11b2 negative Zellen desselben Tumors und ebenfalls signifikant weniger als Cyp11b2 positive Zellen von aldosteronproduzierenden Adenomen mit einer Mutation in einem anderen Genotyp (CACNA1D, ATP1A1, ATP2B3). Immunhistochemisch fand sich zudem eine geringere KCNJ5 Färbung bei Adenomen mit KCNJ5 Mutation verglichen mit der benachbarten gesunden Nebennierenrinde (66; 67). Die Arbeitsgruppe schließt daraus, dass nur ein niedriges Expressionslevel von mutiertem KCNJ5 mit einem Überleben der Zellen vereinbar ist. Das Transkriptionsprofil von Adenomen mit KCNJ5 Mutation unterscheidet sich von Adenomen mit einer anderen Genmutation (68). Möglicherweise führt Selektionsdruck zu einer Expression von antiapoptotischen Faktoren, die dem proapoptotischem Effekt der KCNJ5 Mutationen G451A und T503G entgegenwirken und so das Überleben bei niedriger Expression ermöglicht (66).

4.2 Körper – und Organgewichte

Die erhöhte Prävalenz eines metabolischen Syndroms mit Adipositas bei Patienten mit Conn-Syndrom ist gut belegt (69). Ebenso treten kardiovaskuläre Komplikationen mit Endorganschäden gehäuft auf (45). Sollten Mäuse mit Mutation im eingebrachten Plasmid einen primären Hyperaldosteronismus aufweisen, wären Unterschiede sowohl im Körpergewicht als auch Organgewicht denkbar. Vergleichbar mit dem Krankheitsbild beim Menschen könnte der Hypertonus zudem zu einer hypertensiven Nephropathie mit morphologisch detektierbarer Veränderung führen. Am Herzen wäre eine hypertensive Kardiomyopathie denkbar. Hierbei kommt es unter anderem durch eine anhaltende v.a. linksventrikuläre Druckbelastung zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten. Das Herzgewicht bei Tieren mit Mutation im eingebrachten Plasmid wäre höher. Auch eine daraus resultierende Herzinsuffizienz mit folglich ggf. Ödembildung könnte sich insbesondere älteren Tieren in Form eines erhöhten Körpergewichts widerspiegeln. Um etwaige Unterschiede zwischen unseren verschiedenen Mauslinien detektieren zu können und damit Hinweise auf einen primären Hyperaldosteronismus zu sammeln, wurde das

Körpergewicht der Tiere sowie das Gewicht der einzelnen Organe – Herz, Nebenniere, Nieren – bestimmt und verglichen.

Sowohl *KCNJ5*^{G451A} als auch *KCNJ5*^{T503G} Tiere waren nach Kochsalzbelastung signifikant schwerer als gleichaltrige *KCNJ5*^{wt} Mäuse. Ebenfalls schwerer waren 40 Wochen alte *KCNJ5*^{G451A} Männchen verglichen mit *KCNJ5*^{wt} Tieren. Bei den Weibchen fanden sich zwar keine Signifikanzen, aber auch hier waren 40 Wochen alte *KCNJ5*^{G451A} Mäuse tendenziell schwerer als *KCNJ5*^{wt} Tiere (p=0,11).

Gut mit der Literatur vereinbar waren also Tiere mit Mutation im *KCNJ5*-Gen tendenziell schwerer als Mäuse ohne eine solche Mutation. So konnte unter anderem in einer Studie von Fallo et al. gezeigt werden, dass die Prävalenz eines metabolischen Syndroms mit Adipositas bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus besonders hoch ist (verglichen mit einer Kontrollgruppe essentieller Hypertoniker) (69). Insbesondere scheint bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus nach Studienlage sowohl die Insulinresistenz und Glukosetoleranz gestört zu sein (70; 71), als auch signifikant häufiger ein Diabetes mellitus vorzuliegen, jeweils verglichen mit einer Gruppe essentieller Hypertoniker (72). Einer Kollaboration unter Beteiligung der Universität Birmingham und LMU München gelang es, arteriellen Hypertonus, Adipositas, gestörte Glukosetoleranz und Diabetes mellitus bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus in Kontext zu setzen (73). Mittels Massenspektrometrie im 24h-Sammelurin wurde die Steroidexkretion zwischen Conn-Patienten und Patienten mit endokrin inaktivem Adenom, Patienten mit subklinischem Cortisol-produzierendem-Adenom und solchen mit endogenem Cushingsyndrom (manifest Cortisol-produzierendem-Adenom) verglichen. In der primärem Hyperaldosteronismusgruppe konnte ein „Glukokortikoidexzess“ nachgewiesen werden. Höhere Cortisolwerte als in diesem Patientenkollektiv fanden sich lediglich bei Patienten mit einem manifesten endogenem Cushingsyndrom (73). Das Ausmaß des „Glukotikoidexzesses“ korrelierte dabei signifikant mit den kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hüftumfang, Body-Mass-Index, Dyslipidämie und Insulinresistenz, nicht aber mit der Aldosteronsekretion. Ein Schlüsselenzym könnte dabei Cyp11b1 darstellen. Hier fanden die Forscher Hinweise für eine autonome Regulation (73). Die 11β-Hydroxylase stellt nicht nur ein Schlüsselenzyme der Aldosteronsynthese dar (Umwandlung 11-

Desoxycorticosteron zu Corticosteron), sondern katalysiert auch die Umwandlung von 11-Desoxycortisol zu Cortisol. Patienten mit „Glukokortikoidexzess“ profitierten dabei von einer Adrenektomie. So ist – klinisch relevant – beispielsweise das Risiko für osteoporotische Frakturen bei Conn-Patienten die „nur“ mit einem Aldosteronantagonisten behandelt werden deutlich erhöht, verglichen mit denen die adrenektomiert wurden (74).

Bei den Männchen waren Unterschiede im Gewicht der Nebennieren, insbesondere nach Kochsalzbelastung auffällig. Unter NaCl Belastung waren Nebennieren von Tieren mit Mutation im *KCNJ5*-Gen signifikant schwerer als die von *KCNJ5^{wt}* Tieren. Ein erhöhtes Gewicht der Nebennieren wäre durch eine Nebennierenhyperplasie, Adenome o.ä. erklärbar. Betrachtet man das relative Organgewicht, war dieser Unterschied jedoch nicht mehr nachvollziehbar. Zum sicheren Nachweis von wesentlichen Unterschieden müssten weitere Färbungen und eine Vermessung der Nebennierenzonen erfolgen.

4.3 Expression von Enzymen der Steroidbiosynthese

4.3.1 Basaler Phänotyp nach 8 Wochen und nach 40 Wochen

Unserer Hypothese nach, ist durch Expression der mutierten *KCNJ5*-Kanäle bei transgenen Tieren eine gesteigerte Synthese von Aldosteron und der dafür benötigten Enzyme StAR, Scc, Hsd3b1, Cyp11b1, Cyp11b2 zu erwarten. Möglich basale Effekte einer ektopten *KCNJ5*-Mutation sind in der Interpretation zu beachten.

Da Steroidhormone nach ihrer Synthese ausgeschüttet und nicht gespeichert werden, ist der erste Schritt, die Konversion von Cholesterol zu Pregnenolon, geschwindigkeitslimitierend und spielt vor allem in der akuten Aktivierung der Aldosteronsynthese die entscheidende Rolle. Dieser Schritt beinhaltet den Transport von Cholesterin von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran und wird durch die Expression und Phosphorylierung von StAR reguliert (12; 75; 76). Eine Phosphorylierung führt dabei zu einer gesteigerten StAR Aktivität, durch cAMP steigt die Expression und ebenfalls die Aktivität (76). Chronisch ist eine gesteigerte Aldosteronproduktion von einer quantitativen Steigerung aller beteiligten Enzyme, insbesondere der Aldosteronsynthese abhängig (77; 78). Effekte der Keimbahnmutation T158A des *KCNJ5*-Kanals auf die akute und chronische Regulierung der Aldosteronproduktion konnten bereits nachgewiesen

werden. $KCNJ5^{T158A}$ Expression führt demnach zu einer vermehrten Synthese und Phosphorylierung von StAR, sowie zu einer vermehrten Synthese von Cyp11b2 und Aldosteron (77).

Während wir in der Real-Time-PCR keine signifikanten Unterschiede zwischen weiblichen $KCNJ5^{wt}$ - und wildtyp-Tieren sahen. Konnte bei weiblichen 8 Wochen alten $KCNJ5^{G451A}$ Weibchen in der Tat eine signifikant höhere Expression für alle Enzyme der Steroidbiosynthese mit Ausnahme der Aldosteronsynthese selbst nachgewiesen werden. Allerdings war auch hier ein klarer Trend in Richtung einer erhöhten Expression auffällig. Ganz ähnlich den $KCNJ5^{G451A}$ Tieren zeigten $KCNJ5^{T503G}$ Weibchen eine signifikante Überexpression der meisten Enzyme – auch der Aldosteronsynthese was bezüglich des Expressionsmusters mit einem primären Hyperaldosteronismus vereinbar wäre und gut mit der bisherigen Studienlage vereinbar ist. Die Auswirkungen der Mutationen auf die Steroidhormonproduktion wurden auch an 40 Wochen alten Mäusen untersucht und können die bei den 8 Wochen alten Tieren gewonnen Eindrücke und Ergebnisse zum großen Teil bestätigen. Wie bei 8 Wochen alten Weibchen fand sich in der real-time-PCR auch bei 40-Wochen alten Tieren mit Mutation im eingebrachten Plasmid eine signifikant gesteigerte Expression der Aldosteronsynthese. Auch Scc war bei 40 Wochen alten $KCNJ5^{G451A}$ Weibchen erhöht. Allerdings war hier gegenläufig zu unserer Hypothese Cyp11b1, StAR und Hsd3b1 erniedrigt.

Bei 8- Wochen alten Männchen zeigte sich in der $KCNJ5^{T503G}$ Gruppe eine signifikante Überexpression von StAR, wie dargestellt gut vereinbar mit unseren weiteren Ergebnissen und der Literatur. Anders als vermutet war Scc in beiden transgenen, mutierten Mauslinien bei 8 Wochen alten Männchen erniedrigt. Einschränkend muss erwähnt werden, dass P450-Scc bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Am Menschen konnte kein Unterschied im Scc-RNA Gehalt bei Patienten mit Aldosteron produzierendem Adenom und idiopathischer nodulärer Hyperplasie nachgewiesen werden (79). Bei 40 Wochen alten Männchen konnte eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression von StAR, sowohl bei $KCNJ5^{G451A}$ Tieren als auch in der $KCNJ5^{T503G}$ Gruppe nachgewiesen werden. Diese Überexpression sahen wir auch bei 8-Wochen alten Böcken in der $KCNJ5^{T503G}$ Gruppe.

Unterschiede zwischen den Geschlechtern waren zu erwarten. Von Mutationen im KCNJ5 Gen sind besonders weibliche Patienten mit Aldosteron produzierendem Adenom betroffen. In jedem zweiten Adenom von Europäerinnen war eine Mutation in diesem Gen nachweisbar, bei den Männern nur in 20% der Fälle (59; 80). Diese Prädominanz zeigte sich auch in asiatischen Studien. Hier lag die Prävalenz sogar um die 70% oder mehr (81; 82). Die Gründe hierfür sind weiterhin nicht geklärt, ähnliches ist aber aus einem anderen Tiermodell bekannt. Bei TASK-1 Kaliumkanal knock-out Mäusen waren nur Weibchen von einem Hyperaldosteronismus betroffen (83). Ursächlich konnte eine abnorme Expression der Aldosteronsynthase in der Zona fasciculata nachgewiesen werden. Die Männchen zeigten hingegen keine Symptomatik. Grund hierfür ist eine protektive androgenregulierte kompensatorische TASK-3 Expression (83; 84).

4.3.2 Kochsalzbelastungstest

Der Kochsalzbelastungstest dient in der Diagnostik des primären Hyperaldosteronismus dem Nachweis der fehlenden Supprimierbarkeit von Aldosteron. Durch Zufuhr von Kochsalz kommt es bei Gesunden physiologischer Weise zu einer Suppression des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und somit zu einer Verringerung der Synthese und Sekretion der Produkte dieses Regelkreises. Erfolgt keine Absenkung, kann ein primärer Hyperaldosteronismus postuliert werden. Hierbei spielen klinisch zwei verschiedene Tests eine Rolle. Zum einen der orale Kochsalzbelastungstest, bei dem Patienten für 3 Tage ihren Kochsalzkonsum auf mehr als 6g/d steigern. Im Anschluss wird der Aldosterongehalt im 24h Sammelurin bestimmt. Wird ein Aldosterongehalt über 12µg/24h (47) nachgewiesen liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit ein primärer Hyperaldosteronismus vor. Zum anderen der intravenöse Kochsalzbelastungstest, bei dem Patienten einer Volumen- und Kochsalzbelastung mit 2l NaCl 0,9% über 4 Stunden ausgesetzt werden. Plasmaaldosteronspiegel über 10 ng/dl (47) Sprechen für einen primären Hyperaldosteronismus. In einer modifizierten Form mit höherer Sensitivität sitzen die Patienten während und nach Kochsalzinfusion (47). In unserem Versuchsaufbau wurden 7 Wochen alte Tiere einer oralen Kochsalzbelastung für 7 Tage ausgesetzt.

Unsere theoretischen Erwartungen (*KCNJ5*^{G451A} bzw. *KCNJ5*^{T503G} haben ein höheres Cyp11b2 Expressionslevel als *KCNJ5*^{wt} Tiere) wurden in den Real-Time-PCR Ergebnissen bestätigt. *KCNJ5*^{G451A} bzw. *KCNJ5*^{T503G} Weibchen exprimierten signifikant mehr Cyp11b2 als *KCNJ5*^{wt} Tiere. Auch *KCNJ5*^{T503G} Männchen synthetisierten mehr Aldosteronsynthese. Lediglich auf Grund einer etwas hohen Streubreite war der Unterschied in der *KCNJ5*^{G451A} Gruppe nicht signifikant. Zudem war Scc bei beiden Geschlechtern erhöht. Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse für eine fehlende Supprimierbarkeit von Aldosteron nach Kochsalzbelastung, bei Mäusen mit integriertem mutiertem Plasmid.

4.3.3 ACTH-Stimulationstest

Neben Angiotensin II und Kalium gehört ACTH zu den Hauptstimulatoren der Aldosteronproduktion und Freisetzung. ACTH bindet an seinen spezifischen Melanocortin Typ 2 Rezeptor (MC2R) in Zellen der Zona glomerulosa und fasciculata. Über eine G-Protein Kaskade kommt es zu einem intrazellulären Anstieg von cAMP und dadurch zu einer Aktivierung der Proteinkinase A, was wiederum zu einer erhöhten Aktivität des cAMP responsive element-binding protein (CREB) führt. CREB als Transkriptionsfaktor moduliert positiv die Synthese der Aldosteronsynthese. Außerdem bewirkt eine cAMP Erhöhung einen Calcium Einstrom durch L-Typ-Calcium Kanäle nach intrazellulär. Der erhöhte Calciumgehalt aktiviert über calcium/calmodulin abhängige Proteinkinasen ebenfalls die Aktivität der für die Aldosteronsynthese entscheidenden Transkriptionsfaktoren CREB, NURR1 und NGFIB. Zudem führt ein erhöhter intrazellulärer Calciumspiegel zur Bildung und Aktivierung von StAR (21; 78; 85; 86). Klinische Relevanz besitzt dieser Mechanismus vor allem beim sehr seltenen familiärem Hyperaldosteronismus Typ I, einer autosomal-dominanten Erkrankung, bei der die übermäßige Aldosteronsynthese direkt von der endogenen ACTH Sekretion abhängig ist (47; 87).

Diagnostisch konnte in Studien belegt werden, dass Patienten mit aldosteronproduzierenden Adenome ausgeprägter auf eine ACTH Stimulation reagieren, als solche mit einer BAH oder einer essentiellen Hypertonie und nochmals stärker als ein gesundes Kollektiv (85). Geht man somit davon aus, dass eine ACTH-Stimulation bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus eine größere Rolle spielt als bei Gesunden, so wäre ein Anstieg aller Enzyme der Steroidbiosynthese in der Real-Time-PCR bei Mäusen mit Mutation zu erwarten.

Wie zu erwarten, fand sich bei *KCNJ5*^{G451A} und *KCNJ5*^{T503G} Weibchen eine Stunde nach ACTH Stimulation ein signifikant gesteigertes Expressionslevel von StAR, Cyp11b1 und Hsd3b1. Allerdings war bei beiden Mauslinien ein signifikant reduzierter mRNA-Gehalt der Aldosteronsynthese verglichen mit *KCNJ5*^{wt} Mäusen feststellbar. Die wenigen untersuchten Männchen scheinen das Ergebnis bei den Weibchen zu bestätigen. Wenn auch auf Grund der kleinen Stückzahl nicht signifikant, so sahen wir bei *KCNJ5*^{T503G} Männchen bereits einen deutlichen Trend in Richtung gesteigerter Expression der Enzyme StAR, Cyp11b1 und Hsd3b1.

Zusammenfassend war nach ACTH Stimulation bei unseren transgenen Tieren mit Mutation im *KCNJ5* Gen wie zu erwarten ein gesteigertes Expressionslevel der meisten untersuchten Enzyme auffällig.

4.4 Plasmaaldosteronkonzentration

Bei Tieren mit Mutation im *KCNJ5* Gen und Phänotyp eines primären Hyperaldosteronismus wäre ein höherer Aldosteronspiegel verglichen mit *KCNJ5*^{wt} Mäusen zu erwarten gewesen, ganz analog zur Expression der Aldosteronsynthese in der real-time-PCR. Hier sahen wir jedoch weder bei Weibchen noch bei Männchen einen signifikanten Unterschied. Eine normale Aldosteronproduktion schließt jedoch einen relevanten Hyperaldosteronismus nicht aus, weshalb in der Diagnostik auf den typischerweise erniedrigten Plasma-Renin-Gehalt ebenfalls zurückgegriffen wird, mit einem entsprechend erhöhten Aldosteron-Renin-Quotienten (47). Plasmarenin wurde in dieser Arbeit nicht mitbestimmt. Zur weiteren Abklärung könnte zudem der Plasmaaldosterongehalt nach Kochsalzbelastungstest bestimmt werden. Hier wäre wie bereits erwähnt eine fehlende Supprimierbarkeit in der *KCNJ5*^{G451A} und *KCNJ5*^{T503G} Gruppe zu erwarten gewesen.

Neben ACTH-Stimulation und Kochsalzbelastungstest wäre als eine weitere Testgruppe ein Fludrocortison-Suppressionstest und eine konsekutive Bestimmung des Plasmaaldosteronspiegels möglich gewesen. Fludrocortison ist ein synthetisches Aldosteronderivat mit vor allem einer mineralkortikoiden Wirkung. In der Diagnostik des primären Hyperaldosteronismus erhalten Patienten dabei Fludrocortison 0,1 mg oral alle 6 Stunden für 4 Tage. Physiologischerweise ist bei Gesunden nach exogener Mineralkortikoidzufuhr

durch negative Rückkoppelung des RAAS eine erniedrigte Plasmaaldosteronkonzentration nachzuweisen. Diese Supprimierung des Aldosteronspiegels fehlt bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus und wäre möglicherweise über das Trunk-Blood nachweisbar (47).

Auf Grund von nicht eindeutigen bzw. falschnegativen Ergebnissen spielt der Captopril-Test in der Diagnostik eine untergeordnete Rolle. Durch den Eingriff in das RAAS mit Hilfe des ACE-Hemmers kommt es bei essentiellen Hypertonikern und Gesunden zur verminderten Synthese von Aldosteron. Der Plasmaaldosterongehalt von Patienten mit Conn-Syndrom bleibt dabei unbeeinflusst (47). Auch nach Captoprilgabe wäre eine Plasmaaldosteronbestimmung im Trunk-Blood aufschlussreich gewesen.

4.5 Ausblick

Als ein möglicher Therapieansatz des primären Hyperaldosteronismus kämen neben klassisch Aldosteronantagonisten, die mit einem Nebenwirkungsprofil mit u.a. Gynäkomastie und mit Incompliance der Patienten behaftet sind, auch Calciumantagonisten, die selektiv den spannungsabhängigen Einstrom von Calcium durch L-Typ-Calciumkanäle blockieren – wie z.B. Verapamil und Nifedipin – in Frage. Die erhöhte Natrium-Permeabilität des KCNJ5-Kanals führt zur Aktivierung dieser Kanäle und letztendlich zu einer gesteigerten Aldosteronproduktion. In mehreren in-vitro-Modellen konnte mit Hilfe eines solchen Calciumantagonisten in sehr hohen Dosen die KCNJ5 vermittelte Aldosteronproduktion und Sekretion inhibiert werden (77; 88). *In vivo* allerdings scheint auch diese Therapie limitiert. Ein Mädchen mit schwerer Form des familiären Hyperaldosteronismus bei Mutation im KCNJ5 Kanal profitierte nicht davon. Auch im Folgenden in-vitro-Modell ließ sich kein Benefit nachweisen, auch nicht von einer Kombinationstherapie (89).

Resümierend kann davon ausgegangen werden, dass Substanzen, die spezifisch den mutierten KCNJ5-Kanal blockieren, eine wichtige Bereicherung in der Therapie von Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus darstellen würden. Solche Substanzen könnten möglicherweise Makrolide und Derivate sein (90). Diese müssten jedoch auch an Tiermodellen getestet werden können. Aufgrund des sehr milden Phänotyps scheint unser Tiermodell für pharmazeutische Studien nur nach Wahl geeigneter und stabiler Endpunkte

geeignet. Die aktuelle Datenlage spricht dafür, dass transgene Mäuse mit ausgeprägtem Phänotyp wahrscheinlich nicht lebensfähig sind. So konnte ein proapoptotischer Effekt der beiden von uns untersuchten Hotspotmutationen c.G451A (p.G151R) und c.T503G (p.L168R) nachgewiesen werden (66). Interessanterweise fördert mindestens eine andere Mutation im KNCJ5 Gen (c.A472G; p.T158A-Mutation) die Proliferation von Nebennierenrindenzellen (66). Mit einem induzierbaren Modell, bei dem die Mutation erst auf einen Stimulus hin angeschaltet wird, könnte diese Schwierigkeiten überwunden werden.

Hiermit stände der Weg offen für die Entdeckung gezielter Substanzen, um dann, je nach Mutation, individualisiert therapieren zu können.

5 Zusammenfassung

Die arterielle Hypertonie ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen und ein wesentlicher Risikofaktor für die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität in der Bevölkerung. Als wichtigste endokrine Ursache einer Hypertonie gilt der primäre Hyperaldosteronismus. In etwa einem Drittel Aldosteron-produzierender Adenome konnten Mutationen im und in der Nähe des Selektivitätsfilters des Kaliumkanals KCNJ5 gefunden werden. Dabei sind mit ca. 20 bzw. 14%, *KCNJ5*^{G451A} und *KCNJ5*^{T503G} die führenden Mutationen.

Ziel des Projekts war die Generierung neuartiger, bislang nicht verfügbarer *in vivo* Modelle mit nebennierenspezifischer Überexpression des Kaliumkanals KCNJ5. Dafür wurde das KCNJ5-Gen bzw. seine Mutanten unter die Kontrolle des *akr1b7*-Promotors gesetzt, um eine Nebennierenrinden-spezifische Expression des Transgens zu erreichen.

Das Projekt war in mehrere Abschnitte eingeteilt, zu denen der Nachweis des erfolgreich eingebrachten Plasmids, der Nachweis und die Quantifizierung von KCNJ5-cDNA, die Darstellung möglicher Unterschiede zwischen den Geschlechtern, sowie die Untersuchung von möglichen Kurzzeiteffekten, eine funktionelle Testung und die Erfassung von Langzeiteffekten gehörte.

Zunächst konnten die verschiedenen in die Tiere eingebrachte Plasmide aus extrahierter genomischer-DNA nachgewiesen werden. Die Expression von KCNJ5 mRNA konnte aus den Nebennieren transgener Tiere nachgewiesen werden. Passend hierzu fanden sich signifikante Unterschiede im Expressionsmuster der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme Cyp11b2, Cyp11b1, StAR, Scc und Hsd3b1. Die bei den 8 Wochen alten Weibchen auffällige Überexpression der Aldosteronsynthese sahen wir auch bei 40 Wochen alten Tieren. Wenn auch nicht immer signifikant, so fand sich bei den Männchen ein gleichsinniges Expressionsmuster. In der funktionellen Testung waren vor allem die Ergebnisse des Kochsalzbelastungstests mit einem primären Hyperaldosteronismus vereinbar.

Es fanden sich jedoch auch einige widersprüchliche Ergebnisse. Nach ACTH Stimulation war wie zu erwarten ein signifikanter Anstieg von StAR, Cyp11b1 und Hsd3b1, sowohl bei *KCNJ5*^{G451A} als auch *KCNJ5*^{T503G} Weibchen nachweisbar,

überraschender Weise allerdings auch ein signifikant reduziertes Expressionslevel von Cyp11b2. Außerdem fanden sich keine Unterschiede in den Plasmaaldosteronkonzentrationen bei 8 Wochen alten Tieren.

Zusammenfassend wurde die KCNJ5 Gensequenzen erfolgreich in das Mausgenom integriert und relevant exprimiert. Wichtige Steroidbiosyntheseenzyme waren überexprimiert und im Kochsalzbelastungstest reguliert. Überraschenderweise ließen sich keine erhöhten Aldosteronkonzentrationen nachweisen, womit insgesamt von einem nur milden primären Hyperaldosteronismus ausgegangen werden muss. Eine tiefergehende Charakterisierung einschließlich kardiovaskulärer Endpunkte wird erforderlich sein, um dieses Tiermodell in präklinischen Studien einsetzen zu können.

1. Bielohuby M, Herbach N, Wanke R, Maser-Gluth C, Beuschlein F, et al. 2007. Growth analysis of the mouse adrenal gland from weaning to adulthood: time- and gender-dependent alterations of cell size and number in the cortical compartment. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E139-46
2. Hammer GD, Parker KL, Schimmer BP. 2005. Minireview: transcriptional regulation of adrenocortical development. *Endocrinology* 146:1018-24
3. Arnold J. 1866. Ein Beitrag zu der feineren Structur und dem Chemismus der Nebennieren. *J. Archiv f. pathol. Anat.* 35:64-107
4. Perkins LM, Payne AH. 1988. Quantification of P450_{scc}, P450(17) alpha, and iron sulfur protein reductase in Leydig cells and adrenals of inbred strains of mice. *Endocrinology* 123:2675-82
5. Nussdorfer GG, Mazzocchi G, Meneghelli V. 1978. Cytophysiology of the adrenal zona fasciculata. *Int Rev Cytol* 55:291-365
6. Nussdorfer GG. 1986. Cytophysiology of the adrenal cortex. *Int Rev Cytol* 98:1-405
7. Beuschlein F, Keegan CE, Bavers DL, Mutch C, Hutz JE, et al. 2002. SF-1, DAX-1, and ar: molecular determinants of adrenocortical growth and steroidogenesis. *Endocr Res* 28:597-607
8. Hershkovitz L, Beuschlein F, Klammer S, Krup M, Weinstein Y. 2007. Adrenal 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the mouse catabolizes progesterone and 11-deoxycorticosterone and is restricted to the X-zone. *Endocrinology* 148:976-88
9. Joachim Rassow KH, Roland Netzker, Rainer Deutzmann. 2016. *Duale Reihe Biochemie*. Stuttgart: Thieme
10. Siegenthaler W. 2018. *Klinische Pathophysiologie*. Stuttgart: Thieme
11. Mostaghel EA. 2014. Abiraterone in the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer Manag Res* 6:39-51
12. Hattangady NG, Olala LO, Bollag WB, Rainey WE. 2012. Acute and chronic regulation of aldosterone production. *Mol Cell Endocrinol* 350:151-62
13. Hans-Christian Pape AK, Stefan Silbernagl 2018. *Physiologie*. Stuttgart: Thieme
14. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, et al. 1989. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 165:196-203
15. Mignery GA, Sudhof TC. 1990. The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol-1,4,5-triphosphate receptor. *EMBO J* 9:3893-8
16. Rhee SG, Suh PG, Ryu SH, Lee SY. 1989. Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* 244:546-50
17. Burnay MM, Python CP, Vallotton MB, Capponi AM, Rossier MF. 1994. Role of the capacitative calcium influx in the activation of steroidogenesis by angiotensin-II in adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 135:751-8
18. Penton D, Bandulik S, Schweda F, Haubs S, Tauber P, et al. 2012. Task3 potassium channel gene invalidation causes low renin and salt-sensitive arterial hypertension. *Endocrinology* 153:4740-8
19. Davies LA, Hu C, Guagliardo NA, Sen N, Chen X, et al. 2008. TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2203-8
20. Brenner T, O'Shaughnessy KM. 2008. Both TASK-3 and TREK-1 two-pore loop K channels are expressed in H295R cells and modulate their membrane potential and aldosterone secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E1480-6
21. Spat A, Hunyady L, Szanda G. 2016. Signaling Interactions in the Adrenal Cortex. *Front Endocrinol (Lausanne)* 7:17
22. Voisey J, Carroll L, van Daal A. 2003. Melanocortins and their receptors and antagonists. *Curr Drug Targets* 4:586-97
23. Labeit AM, Klotsche J, Pieper L, Pittrow D, Einsle F, et al. 2012. Changes in the prevalence, treatment and control of hypertension in Germany? A clinical-epidemiological study of 50.000 primary care patients. *PLoS One* 7:e52229
24. Organization WH. 2019. *Blood pressure prevalence*.

25. Herold G, ed. 2015. *Innere Medizin*. Köln. 237-60 pp.
26. Organization WH. 2013. *Fact-sheet-World-Health-Day-2013*.
http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0012/185997/Fact-sheet-World-Health-Day-2013-Ger-final.pdf?ua=1
27. Pickering G. 1972. Hypertension. Definitions, natural histories and consequences. *Am J Med* 52:570-83
28. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. 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. *Lancet* 360:1903-13
29. Kalaitzidis RG, Bakris GL. 2010. Prehypertension: is it relevant for nephrologists? *Kidney Int* 77:194-200
30. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, et al. 2013. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 34:2159-219
31. Focus. 2013. *Eine Milliarde Menschen betroffen Bluthochdruck – Der stille Killer greift weltweit um sich*.
32. Tagesspiegel. 2018. *Bluthochdruck der stille Killer*.
33. Husain K, Hernandez W, Ansari RA, Ferder L. 2015. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J Biol Chem* 6:209-17
34. Nakashima H, Suzuki H, Ohtsu H, Chao JY, Utsunomiya H, et al. 2006. Angiotensin II regulates vascular and endothelial dysfunction: recent topics of Angiotensin II type-1 receptor signaling in the vasculature. *Curr Vasc Pharmacol* 4:67-78
35. Jordan J, Kurschat C, Reuter H. 2018. Arterial Hypertension. *Dtsch Arztebl Int* 115:557-68
36. Conn JW. 1955. Presidential address. I. Painting background. II. Primary aldosteronism, a new clinical syndrome. *J Lab Clin Med* 45:3-17
37. Conn JW, Louis LH. 1956. Primary aldosteronism, a new clinical entity. *Ann Intern Med* 44:1-15
38. Fogari R, Preti P, Zoppi A, Rinaldi A, Fogari E, Mugellini A. 2007. Prevalence of primary aldosteronism among unselected hypertensive patients: a prospective study based on the use of an aldosterone/renin ratio above 25 as a screening test. *Hypertens Res* 30:111-7
39. Gordon RD, Ziesak MD, Tunny TJ, Stowasser M, Klemm SA. 1993. Evidence that primary aldosteronism may not be uncommon: 12% incidence among antihypertensive drug trial volunteers. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 20:296-8
40. Calhoun DA, Nishizaka MK, Zaman MA, Thakkar RB, Weissmann P. 2002. Hyperaldosteronism among black and white subjects with resistant hypertension. *Hypertension* 40:892-6
41. Williams JS, Williams GH, Raji A, Jeunemaitre X, Brown NJ, et al. 2006. Prevalence of primary hyperaldosteronism in mild to moderate hypertension without hypokalaemia. *J Hum Hypertens* 20:129-36
42. Beuschlein F, Boulkroun S, Osswald A, Wieland T, Nielsen HN, et al. 2013. Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. *Nat Genet* 45:440-4, 4e1-2
43. Allolio S, ed. 2010. *Praktische Endokrinologie*: Elsevier. 231-6 pp. 2. Edition ed.
44. Rossi GP, Bernini G, Caliumi C, Desideri G, Fabris B, et al. 2006. A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 48:2293-300
45. Catena C, Colussi G, Nadalini E, Chiuch A, Baroselli S, et al. 2008. Cardiovascular outcomes in patients with primary aldosteronism after treatment. *Arch Intern Med* 168:80-5

46. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. 2005. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol* 45:1243-8
47. Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, et al. 2016. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 101:1889-916
48. Arlt W. 2010. A detour guide to the Endocrine Society Clinical Practice Guideline on case detection, diagnosis and treatment of patients with primary aldosteronism. *Eur J Endocrinol* 162:435-8
49. Schirpenbach C, Segmiller F, Diederich S, Hahner S, Lorenz R, et al. 2009. The diagnosis and treatment of primary hyperaldosteronism in Germany: results on 555 patients from the German Conn Registry. *Dtsch Arztebl Int* 106:305-11
50. Volpe C, Hamberger B, Hoog A, Mukai K, Calissendorff J, et al. 2015. Primary aldosteronism: functional histopathology and long-term follow-up after unilateral adrenalectomy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 82:639-47
51. Meyer A, Brabant G, Behrend M. 2005. Long-term follow-up after adrenalectomy for primary aldosteronism. *World J Surg* 29:155-9
52. Volpe C, Enberg U, Sjogren A, Wahrenberg H, Jacobsson H, et al. 2008. The role of adrenal scintigraphy in the preoperative management of primary aldosteronism. *Scand J Surg* 97:248-53
53. Fernandes-Rosa FL, Williams TA, Riester A, Steichen O, Beuschlein F, et al. 2014. Genetic spectrum and clinical correlates of somatic mutations in aldosterone-producing adenoma. *Hypertension* 64:354-61
54. Choi M, Scholl UI, Yue P, Bjorklund P, Zhao B, et al. 2011. K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* 331:768-72
55. Scholl UI, Goh G, Stolting G, de Oliveira RC, Choi M, et al. 2013. Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. *Nat Genet* 45:1050-4
56. Azizan EA, Poulsen H, Tuluc P, Zhou J, Clausen MV, et al. 2013. Somatic mutations in ATP1A1 and CACNA1D underlie a common subtype of adrenal hypertension. *Nat Genet* 45:1055-60
57. Williams TA, Monticone S, Mulatero P. 2015. KCNJ5 mutations are the most frequent genetic alteration in primary aldosteronism. *Hypertension* 65:507-9
58. Akerstrom T, Crona J, Delgado Verdugo A, Starker LF, Cupisti K, et al. 2012. Comprehensive re-sequencing of adrenal aldosterone producing lesions reveal three somatic mutations near the KCNJ5 potassium channel selectivity filter. *PLoS One* 7:e41926
59. Boulkroun S, Beuschlein F, Rossi GP, Golib-Dzib JF, Fischer E, et al. 2012. Prevalence, clinical, and molecular correlates of KCNJ5 mutations in primary aldosteronism. *Hypertension* 59:592-8
60. Yang Y, Yang Y, Liang B, Liu J, Li J, et al. 2010. Identification of a Kir3.4 mutation in congenital long QT syndrome. *Am J Hum Genet* 86:872-80
61. Fischer E, Beuschlein F. 2014. Novel genes in primary aldosteronism. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 21:154-8
62. Kaplan JH. 2002. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem* 71:511-35
63. Di Leva F, Domi T, Fedrizzi L, Lim D, Carafoli E. 2008. The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation. *Arch Biochem Biophys* 476:65-74
64. Baig SM, Koschak A, Lieb A, Gebhart M, Dafinger C, et al. 2011. Loss of Ca(v)1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat Neurosci* 14:77-84

65. Lambert-Langlais S, Val P, Guyot S, Ragazzon B, Sahut-Barnola I, et al. 2009. A transgenic mouse line with specific Cre recombinase expression in the adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol* 300:197-204
66. Yang Y, Gomez-Sanchez CE, Jaquin D, Aristizabal Prada ET, Meyer LS, et al. 2019. Primary Aldosteronism: KCNJ5 Mutations and Adrenocortical Cell Growth. *Hypertension* 74:809-16
67. Boulkroun S, Golib Dzib JF, Samson-Couterie B, Rosa FL, Rickard AJ, et al. 2013. KCNJ5 mutations in aldosterone producing adenoma and relationship with adrenal cortex remodeling. *Mol Cell Endocrinol* 371:221-7
68. Backman S, Akerstrom T, Maharjan R, Cupisti K, Willenberg HS, et al. 2019. RNA Sequencing Provides Novel Insights into the Transcriptome of Aldosterone Producing Adenomas. *Sci Rep* 9:6269
69. Fallo F, Veglio F, Bertello C, Sonino N, Della Mea P, et al. 2006. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 91:454-9
70. Catena C, Lapenna R, Baroselli S, Nadalini E, Colussi G, et al. 2006. Insulin sensitivity in patients with primary aldosteronism: a follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3457-63
71. Fallo F, Pilon C, Urbanet R. 2012. Primary aldosteronism and metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 44:208-14
72. Reincke M, Meisinger C, Holle R, Quinkler M, Hahner S, et al. 2010. Is primary aldosteronism associated with diabetes mellitus? Results of the German Conn's Registry. *Horm Metab Res* 42:435-9
73. Arlt W, Lang K, Sitch AJ, Dietz AS, Rhayem Y, et al. 2017. Steroid metabolome analysis reveals prevalent glucocorticoid excess in primary aldosteronism. *JCI Insight* 2
74. Wu VC, Chang CH, Wang CY, Lin YH, Kao TW, et al. 2017. Risk of Fracture in Primary Aldosteronism: A Population-Based Cohort Study. *J Bone Miner Res* 32:743-52
75. Arakane F, King SR, Du Y, Kallen CB, Walsh LP, et al. 1997. Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J Biol Chem* 272:32656-62
76. Fleury A, Mathieu AP, Ducharme L, Hales DB, LeHoux JG. 2004. Phosphorylation and function of the hamster adrenal steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Steroid Biochem Mol Biol* 91:259-71
77. Hattangady NG, Karashima S, Yuan L, Ponce-Balbuena D, Jalife J, et al. 2016. Mutated KCNJ5 activates the acute and chronic regulatory steps in aldosterone production. *J Mol Endocrinol* 57:1-11
78. Bassett MH, White PC, Rainey WE. 2004. The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol Cell Endocrinol* 217:67-74
79. Fang Y, Zhao L, Zang M, Chen S, Yan F, et al. 2010. A dispensable role for P450(scc) in the overproduction of aldosterone in aldosterone-producing adenoma and idiopathic hyperaldosteronism in patients with primary aldosteronism. *Pathol Oncol Res* 16:589-92
80. Mulatero P, Monticone S, Rainey WE, Veglio F, Williams TA. 2013. Role of KCNJ5 in familial and sporadic primary aldosteronism. *Nat Rev Endocrinol* 9:104-12
81. Zheng FF, Zhu LM, Nie AF, Li XY, Lin JR, et al. 2015. Clinical characteristics of somatic mutations in Chinese patients with aldosterone-producing adenoma. *Hypertension* 65:622-8
82. Kitamoto T, Suematsu S, Matsuzawa Y, Saito J, Omura M, Nishikawa T. 2015. Comparison of cardiovascular complications in patients with and without KCNJ5 gene mutations harboring aldosterone-producing adenomas. *J Atheroscler Thromb* 22:191-200

83. Heitzmann D, Derand R, Jungbauer S, Bandulik S, Sterner C, et al. 2008. Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. *EMBO J* 27:179-87
84. Gomez-Sanchez CE, Oki K. 2014. Minireview: potassium channels and aldosterone dysregulation: is primary aldosteronism a potassium channelopathy? *Endocrinology* 155:47-55
85. El Ghorayeb N, Bourdeau I, Lacroix A. 2016. Role of ACTH and Other Hormones in the Regulation of Aldosterone Production in Primary Aldosteronism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 7:72
86. Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, White PC, Rainey WE. 2004. The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production. *Mol Endocrinol* 18:279-90
87. McMahon GT, Dluhy RG. 2004. Glucocorticoid-remediable aldosteronism. *Cardiol Rev* 12:44-8
88. Kuppusamy M, Caroccia B, Stindl J, Bandulik S, Lenzini L, et al. 2014. A novel KCNJ5-insT149 somatic mutation close to, but outside, the selectivity filter causes resistant hypertension by loss of selectivity for potassium. *J Clin Endocrinol Metab* 99:E1765-73
89. Monticone S, Bandulik S, Stindl J, Zilbermint M, Dedov I, et al. 2015. A case of severe hyperaldosteronism caused by a de novo mutation affecting a critical salt bridge Kir3.4 residue. *J Clin Endocrinol Metab* 100:E114-8
90. Scholl UI, Abriola L, Zhang C, Reimer EN, Plummer M, et al. 2017. Macrolides selectively inhibit mutant KCNJ5 potassium channels that cause aldosterone-producing adenoma. *J Clin Invest* 127:2739-50

Selbstständigkeitserklärung

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit bestätige ich, Philipp Lorenz Schmid, geboren am 14.10.1984 in München an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Phänotypische Charakterisierung transgener Mauslinien mit
nebenierenspezifischer Expression von KCNJ5

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schriftum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Landshut, 14.02.2022

Philipp Lorenz Schmid

Landshut, im Februar 2022

Philipp Lorenz Schmid

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Beteiligten danken, die mir mein Studium und meine Promotion ermöglicht und mich auf diesem langen Weg begleitet haben.

Meinen Eltern gilt besonderer Dank und ich möchte Sie deshalb an erster Stelle nennen. Sie haben immer an mich geglaubt und mir meine doppelte universitäre Ausbildung erst ermöglicht. Sie haben sich in die Thematik meiner Promotion eingelesen und die Arbeit auf Plausibilitäts- und formale Fehler korrigiert. Danke für Alles.

Ein weiterer, ganz spezieller Dank gilt meiner wunderbaren Frau Sophie und meiner kleinen Tochter Mathilda. Immer hast Du – Sophie – mir den Rücken freigehalten. Nur mit Hilfe eurer Motivation, eurem Engagement und eurer Unterstützung war ein Abschluss der Arbeit möglich. Ich liebe euch.

Auch bei meinen beiden Schwestern und meinen Großeltern möchte ich mich bedanken. Ihr alle seid in vielen Punkten Vorbilder, ihr alle habt einen entscheidenden Anteil zu meiner persönlichen Entwicklung beigetragen.

Ein großes Dankeschön muss auch meiner Schwiegerfamilie ausgesprochen werden. Ihr habt mich herzlich aufgenommen, stets in vielerlei Dingen gut beraten und habt nicht nur zur mündlichen Prüfung die Kleine gesittet. Danke für eure Unterstützung.

Nicht vergessen werden dürfen alle meine Freunde die mich den ganzen Weg – teils auch als Leidensgenossen – begleitet haben und mit denen ich wunderbare spaßige Jahre hatte. Insbesondere Danke dir Basti. Natürlich auch ein Dankeschön an alle Freunde, die mich durch Sport und Unternehmungen ablenken konnten. Durch euch konnte ich immer wieder zu Kraft und Stärke finden.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Arbeitsgruppe. Nur durch die Einarbeitung von Igor und allen voran Dank der unendlichen Motivation und fachlichen Unterstützung von Brigitte bin ich über all die Jahre am Ball geblieben und schließlich ans Ziel gelangt.

Last but not least möchte ich Herrn Prof. Dr. Beuschlein und PD. Dr. Lichtenauer Danke sagen. Durch Ihr Vertrauen erhielt ich einen prägenden Einblick in die Grundlagenforschung und experimentelle Arbeits- und Denkweise. Sie waren zu jeder Zeit, auch in Phasen von Rückschlägen, Zeiten des Umbruchs und des Fortzugs als Mentoren mit fachlichen Ratschlägen präsent und haben mich in

meinem Vorhaben unterstützt. Ihre positive Art und Stärke sind außergewöhnlich und beide waren stets eine große Stütze für mich.

Curriculum Vitae