

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Funktionsbereich Spezielle Endokrinologie
Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott

Promoterpolymorphismen der Aldosteronsynthese als molekulare Grundlage
zur Entwicklung eines Testsystems für den Familiären Hyperaldosteronismus
Typ 1 und funktionelle Konsequenzen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Till Dringenberg
2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Holger Sven Willenberg

Zweitgutachterin: PD Dr. med. Julia Szendrödi

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Dringenberg T, Schwitalla M, Haase M, Scherbaum WA, Willenberg HS (2013) Control of CYP11B2/CYP11B1 Expression Ratio and Consequences for the Zonation of the Adrenal Cortex. *Horm Metab Res.* 45, 81-85

Dringenberg T, Sorokina M, Ehlers M, Dekomien G, Haase M, Schulze E, Quinkler M, Rump LC, Schott M, Willenberg HS (2016) Evaluation of a Recently Established Test for Familial Hyperaldosteronism Type 1. *Horm Metab Res.* 48, 865-868

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym	HSD3B2	3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
ACTH	Adrenocorticotropin	HRE	hormone response element
Ad1/4	Promotersequenzen	IP3	Inositoltriphosphat
AP-1	activator protein 1	JunD	DNA-Bindungsprotein im Komplex mit FOS
ARQ	Aldosteron-Renin-Quotient	KCNJ5	Gen des TASK-Kanals
AT1R	Angiotensin II-Rezeptor 1	MAPK	mitogen-activated protein-kinase
ATF	CYP11B-assoziierter Transkriptionsfaktor	MC2R	Gen des ACTH-Rezeptors
CAK	CDK-aktivierte Kinase-Komplex	MCR	Mineralocorticoid-Rezeptor
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	MKPI1	Dual specificity protein phosphatase
CamK	Calmodulin-Kinase	NBRE	NGFI-B response element
CBP	CREB binding protein	NGFI-B	neuronal growth factor-induced clone IB
CRE	cAMP response element	NR4A	DNA-Bindungsproteine
CREB	cAMP response element binding protein	OD	Optische Dichte
CREM	CRE modulator	PCR	Polymerase Kettenreaktion
CYP11B1	Gen der 11 β -Hydroxylase	PKA	Proteinkinase A
CYP11B2	Gen der Aldosteronsynthase	PKC	Proteinkinase C
CYP17	Gen der 17 α -Hydroxylase	PRK	Plasma-Renin-Konzentration
DAG	Diacylglycerin	RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
dNTP	Desoxynucleotid-triphosphat	ROMK	Renal Outer Medullary Potassium channel
ddNTP	Didesoxynucleotid-triphosphat	SAK	Serum-Aldosteron-Konzentration
E.coli	Escherichia coli	SF-1	steroidogenic factor 1
ENaC	Epithelialer Natriumkanal	SGK-1	serum and glucocorticoid-inducible kinase
ERK	Extrazellulär regulierbare Kinase	SRC1	steroid receptor coactivator-1
FHA-I	Familiärer Hyperaldosteronismus Typ 1	STAR	Steroidogenic acute regulatory protein
FOS	DNA-Bindungsprotein im Komplex mit JunD	TASK	Kalium-Kanal
G _s	stimulatorisches G-Protein	zF	Zona fasciculata
G _i	inhibitorisches G-Protein	zG	Zona glomerulosa
GRE	Glucocorticoid response element	zR	Zona reticularis

The Familial hyperaldosteronism type 1 (FHA-I) is an autosomal dominant inherited form of primary hyperaldosteronism. A misguided crossing-over between the genes of aldosterone synthase (*CYP11B2*) and 11 β -hydroxylase (*CYP11B1*) generates a hybrid gene (*CYP11B1/B2*), which encodes a modified, ACTH-dependent aldosterone synthase. The clinical consequence is a severe form of mineralocorticoid-induced hypertension, which occurs primarily in the first decades of life. A reliable diagnosis of FHA-I is significant, as the therapy concept differs fundamentally from the common treatment of hypertension. A low-dose administration of dexamethasone suppresses ACTH levels, allowing the mineralocorticoid excess to be normalized.

The aim of this work is to clarify the prevalence of FHA-I in a selected cohort of patients with arterial hypertension in Dusseldorf, Germany. For this purpose, a molecular biological assay for the diagnosis of FHA-I has been established. This assay is based on the polymerase chain reaction according to the studies of Jonsson et al., which can detect *CYP11B2* and *CYP11B1/B2* by specific primer combinations. In order to generate test controls independently of preserved patient material, *CYP11B2* and *CYP11B1/B2* are cloned into stable vectors. This method differs from previously published studies to determine the prevalence of FHA-I, in which DNA from affected patients was predominantly used as test controls. Since preserved patient material is very rare, cloning of the target genes can close existing availability gaps and can realize a sensitive confirmation test for suspected patients. In this work 61 selected patients with arterial hypertension are tested for the presence of *CYP11B1/B2*. In 33 of these patients, primary hyperaldosteronism was diagnosed in advance. Two patients knowingly suffering from FHA-I were blindly included in the protocol. Secondary hypertension was ruled out in the remaining 26 patients so that an essential hypertension could be assumed. All in all, the test protocol shows two positive results that match with the blindly included FHA-I-patients. Further positive results are not registered, which is in accordance with current prevalence data of FHA-I (Dringenberg et al. Horm Metab Res 2016).

In addition to the experimental work, a detailed overview of the gene regulation of aldosterone synthase and 11 β -hydroxylase is presented in this work. Here, superordinate functional principles and their influence on intracellular signalling pathways are explained and combined in the context of the enzyme regulation of steroid biosynthesis. From these findings, a consequence for the functional zonation of the adrenal cortex can be concluded, which is formulated as a hypothesis (Dringenberg et al. Horm Metab Res 2013).

Der Familiäre Hyperaldosteronismus Typ 1 (FHA-I) ist eine autosomal-dominant vererbte Form des primären Hyperaldosteronismus. Ein fehlgeleitetes Crossing-over zwischen den Genen der Aldosteronsynthese (*CYP11B2*) und der 11 β -Hydroxylase (*CYP11B1*) führt zu einem Hybridgen (*CYP11B1/B2*), welches eine abgewandelte, ACTH-abhängige Aldosteronsynthese kodiert. Klinische Folge ist eine früh einsetzende Mineralocorticoid-Hypertonie, die unbehandelt zu schweren kardiovaskulären Komplikationen führen und die Lebenserwartung betroffener Patienten einschränken kann. Der Diagnosestellung des FHA-I kommt eine wichtige Bedeutung zu, da sich das Therapiekonzept grundlegend von der routinemäßigen Behandlung der arteriellen Hypertonie unterscheidet. Eine niedrig dosierte Gabe von Dexamethason kann die peripheren ACTH-Spiegel zuverlässig supprimieren, wodurch sich der Mineralocorticoidexzess normalisieren lässt.

Ziel dieser Arbeit ist die Klärung der Frage, wie häufig ein FHA-I in der Düsseldorfer Kohorte vorkommt. Hierzu wird ein molekularbiologischer Test zur Diagnostik des FHA-I etabliert. Als Grundlage dient die Polymerase-Kettenreaktion nach Jonsson et al., die durch definierte Primer-Kombinationen *CYP11B2* und *CYP11B1/B2* detektiert. Um unabhängig von konserviertem Patientenmaterial über Testkontrollen zu verfügen, werden *CYP11B2* und *CYP11B1/B2* in stabile Vektoren kloniert. Hierin unterscheidet sich der methodische Ansatz von den bisher publizierten Studien zur Prävalenzbestimmung des FHA-I, in denen überwiegend DNA betroffener Patienten als Positivkontrolle des PCR-Assays verwendet wurde. Da der Vorrat an konserviertem Patientenmaterial sehr gering ist, kann die Klonierung der Zielgene vorhandene Verfügbarkeitslücken schließen und einen jederzeit einsetzbaren, sensitiven Bestätigungstest für Verdachtspatienten ermöglichen. Insgesamt werden 61 ausgewählte Patienten mit arterieller Hypertonie auf das Vorliegen von *CYP11B1/B2* getestet. Bei 33 dieser Patienten konnte im Vorfeld ein primärer Hyperaldosteronismus gesichert werden. Zwei Patienten, die wissentlich an einem FHA-I erkrankt sind, werden blind in das Protokoll eingeschlossen. Bei den verbleibenden 26 Patienten wurden sekundäre Hypertonieursachen zuvor ausgeschlossen, so dass hier von einer essenziellen Hypertonie ausgegangen werden kann. In Zusammenschau der gesammelten Daten zeigt das Testprotokoll zwei Positivbefunde an, die mit den blind eingeschlossenen FHA-Patienten übereinstimmen. Weitere Merkmalsträger werden unter den 59 im Rahmen dieser Arbeit erstmals getesteten Patienten nicht erfasst, was in Einklang mit aktuellen Prävalenzdaten steht (Dringenberg et al. Horm Metab Res 2016).

Neben der experimentellen Arbeit erfolgt eine Zusammenstellung verschiedener Studien zur Genregulation der Aldosteronsynthese und 11 β -Hydroxylase. Hierbei werden übergeordnete Funktionsprinzipien und deren Einfluss auf intrazelluläre Signalwege erläutert und vor dem Hintergrund der Enzymregulation der Steroidbiosynthese zusammengeführt. Aus diesen Erkenntnissen lässt sich eine Konsequenz für die funktionelle Zonierung der Nebennierenrinde ableiten, die als Hypothese formuliert wird (Dringenberg et al. Horm Metab Res 2013).

1	Einleitung	Seite
1.1	Der primäre Hyperaldosteronismus	1-4
	1.1.1 Diagnostik	2
	1.1.2 Der Familiäre Hyperaldosteronismus Typ 1	2-4
1.2	Übersicht über die Regulation der <i>CYP11B1</i> - und <i>CYP11B2</i> -Expression	4-11
	1.2.1 <i>Steroidogenic factor 1</i>	7-8
	1.2.2 <i>cAMP response elements</i>	8-9
	1.2.3 <i>Neuronal growth factor-induced clone B</i>	9-11
1.3	Ziel der Arbeit	11-13
	1.3.1 Klonierung von <i>CYP11B2</i>	12
	1.3.2 Klonierung von <i>CYP11B1/B2</i>	12
	1.3.3 Diagnostische Umsetzung	13
2	Patienten, Material und Methoden	
2.1	Patienten	14
2.2	Reagenzien und Enzyme	15
2.3	Extraktion genomischer DNA aus Vollblut	16
2.4	Photometrische Transmissionsmessung	16-17
2.5	Polymerase Kettenreaktion	17-21
2.6	Addition eines Desoxyadenosin-Überhanges	21-22
2.7	Agarose-Gelelektrophorese	22
2.8	Gelextraktion	23
2.9	Transformation und Klonierung	23-26
	2.9.1 Ligation von DNA	24-25
	2.9.2 Transformation und Klonierung	25-26
2.10	Plasmidextraktion	26-27
2.11	Restriktionsverdau	27
2.12	Plasmid Sequenzierung	28

3	Ergebnisse	Seite
3.1	Auswertung der PCR	29
3.2	Klonierung	30
3.3	Restriktionsverdau	31-32
	3.3.1 Restriktion von pCR-XL-TOPO- <i>CYP11B2</i>	31
	3.3.2 Restriktion von pCR-XL-TOPO- <i>CYP11B1/B2</i>	32
3.4	Sequenzierung	33-37
	3.4.1 Sequenzierung des klonierten <i>CYP11B2</i> -Insert	33-34
	3.4.2 Sequenzierung des klonierten <i>CYP11B1/B2</i> -Insert	35-37
3.5	Bruchpunktanalyse	38
3.6	Diagnostisches Assay	38
3.7	Statistische Auswertung der Patientendaten	39-40
4	Diskussion	
4.1	Diskussion der Methode und Ergebnisse	41-45
4.2	Diskussion der Unterschiede zwischen den <i>CYP11B1</i> - und <i>CYP11B2</i> -Promotoren und deren Konsequenzen bezüglich des Aufbaus der Nebennierenrinde	45-49
5	Literaturverzeichnis	50-61
6	Anhang	62-64

1.1 Der primäre Hyperaldosteronismus

Der primäre Hyperaldosteronismus (Conn-Syndrom) beruht auf einer Angiotensin-II unabhängigen Mehrsekretion von Aldosteron. Klinisch manifestiert sich im fortgeschrittenen Stadium das typische Bild einer hypokaliämischen Hypertonie mit metabolischer Alkalose. Diese klassische, unter dem Begriff der Mineralocorticoid-Hypertonie zusammengefasste Trias wurde 1953 von einem polnischen Arzt und 1955 von Jerome Conn beschrieben. In überwiegender Mehrheit liegt der Ursprung des Conn-Syndroms in einem Aldosteronproduzierenden Adenom der Nebennierenrinde (50-70%), gefolgt von den bi- und unilateralen Nebennierenrinden-Hyperplasien (ca. 20-40%, Funder et al. JCEM 2008). Davon abzugrenzen sind seltenere Entitäten wie das Nebennierenrindenzarzinom bzw. die familiären Formen des primären Hyperaldosteronismus (Gordon et al. Steroids 1995). Die systemischen Auswirkungen eines Mineralocorticoidexzesses sind weitreichend. Das Wohlbefinden betroffener Patienten ist durch eher uncharakteristische Symptome wie Müdigkeit, Kopfschmerzen, Palpitationen und eine Polyurie eingeschränkt. Kardiale Folgen eines Hyperaldosteronismus manifestieren sich als links-ventrikuläre Hypertrophie mit konsekutiver diastolischer Dysfunktion (Rossi et al. Hypertension 1996) und als Herzrhythmusstörungen, wobei Letztere in frühen Stadien vorwiegend durch Elektrolytverschiebungen getriggert werden (Hypokaliämie). Ein chronischer, unbehandelter Mineralocorticoidexzess mündet schließlich in eine generalisierte Herzfibrose mit dilatativer Kardiomyopathie (Campbell et al. Blood Press 1992). Der fibrotische Umbau der Vorhofwand erhöht die Inzidenz des permanenten Vorhofflimmerns (Milliez et al. J Am Coll Cardiol 2005). Oxidativer Stress und endotheliale Dysfunktion beeinträchtigen in der Niere sowohl die glomeruläre Filtrationsleistung als auch die Integrität der Basalmembran. Das Auftreten einer Mikroalbuminurie und die Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate treten im Vergleich zur essenziellen Hypertonie häufiger auf (Wu et al. Clin Chim Acta 2011). Histomorphologische Korrelate eines Hyperaldosteronismus sind unter anderem Gefäßwandveränderungen im kardiovaskulären System. Die Mineralocorticoidrezeptoren von Endothel und glatten Muskelzellen beantworten erhöhte Aldosteronspiegel mit *eutrophen remodelling* Prozessen der Widerstandsgefäße und oxidativem Stress, wohin gegen sich die essenzielle Hypertonie eher durch hypertrophische Veränderungen der *Tunica media* mit konsekutiver Einengung des Lumens manifestiert (Sun et al. Cardiovasc Res 1997, Rizzoni et al. Hypertension 1998). Eine Therapie mit dem Aldosteron-Antagonisten Spironolacton verringert signifikant die Rate der endothelialen Dysfunktion bei Patienten mit einem Hyperaldosteronismus (Farquharson et al. Mol Cell Endocrinol 2000). Neben der direkten Aldosteron-Wirkung auf die Gefäßwände spielt vermutlich auch die Suppression des Renin-Angiotensin-System eine Rolle, wobei dessen Interaktion mit Endothel und glatter Muskulatur zu einer Blutdruck unabhängigen

Modellierung vaskulärer Wachstumsprozesse führen kann (Rossi et al. Stroke 1995).

Die Prävalenz des primären Hyperaldosteronismus steigt mit dem Schweregrad der Hypertonie. Im Mittel ist jeder fünfte Patient mit therapierefraktärer Hypertonie von einem Mineralocorticoidexzess betroffen (Gupta et al. Indian J Endocrinol Metab 2011). Die Bestimmung des Aldosteron-Renin-Quotienten (ARQ) als sensitive Screeningmethode führte zu einem erstaunlichen Anstieg der Prävalenzdaten. In einer großangelegten Studie der Gruppe um Fogari et al. wurden 3000 Patienten mit nicht näher klassifizierter Hypertonie auf das Vorliegen eines Conn-Syndroms getestet. 684 (22.8%) zeigten einen auffälligen ARQ von >25 . Im Gegensatz dazu konnte nur bei 44 Patienten eine Hypokaliämie nachgewiesen werden. Das Conn-Syndrom gilt als die häufigste Ursache der sekundären Hypertonie (Fogari et al. Hypertens Res 2007).

1.1.1 Diagnostik

Screening-Indikationen sind das gemeinsame Auftreten von Hypertonie und Hypokaliämie, eine therapierefraktäre Hypertonie (≥ 3 Antihypertensiva und RR $\geq 140/90$), ein adrenales Inzidentalom mit Hypertonie sowie juvenile Hypertoniker mit positiver Familienanamnese (Funder et al. JCEM 2008). Vor den Screening-Tests sind oft Medikamentenumstellungen notwendig, da Interferenzen mit den abzunehmenden Laborparametern häufig sind. Es erfolgt eine morgendliche Blutabnahme im Sitzen. Als Parameter werden die Konzentrationen von Aldosteron im Serum und Renin im Plasma gemessen und ins Verhältnis gesetzt (Hiramoto et al. Arch Intern Med 1981). Bei positivem Testergebnis im Sinne eines pathologisch erhöhten Aldosteron-Renin-Quotienten (ARQ) und Ausschluss anderer wichtiger Einflussfaktoren, wie Hyperkaliämie oder Stress, erfolgt ein Bestätigungstest, z.B. der Kochsalzbelastungs- oder der Fludrocortison-Suppressions-Test. Eine inadäquate Aldosteron-Suppression sichert die Diagnose. Ist ein Hyperaldosteronismus laborchemisch nachgewiesen, erfolgt eine Bildgebung der Nebennieren mittels Dünnschicht-CT oder MRT und bei Patienten, die älter als 35 Jahre sind, zusätzlich eine selektive Nebennierenvenen-Blutentnahme zur Lateralisationsdiagnostik (Funder et al. JCEM 2008).

1.1.2 Der Familiäre Hyperaldosteronismus Typ I

Der Familiäre Hyperaldosteronismus Typ 1 stellt mit ca. 1 % aller Subtypen eine eher seltene Ursache des primären Hyperaldosteronismus dar (Mulatero et al. Hypertension 2011). Dennoch ist es vermutlich eine der häufigsten monogenetischen Ursachen einer Mineralocorticoid-Hypertonie (Halperin et al. Endocrinol Metab Clin North Am 2011). Betroffene

Patienten zeigen bereits in den ersten Lebensdekaden sehr häufig Anzeichen einer schweren Hypertonie, allerdings wurden auch mildere Verlaufsformen beschrieben (Mulatero et al. JCEM 2002). Bei schwangeren Patientinnen steigt zusätzlich das Risiko einer Präeklampsie (Wyckoff et al. Hypertension 2000). Bereits in den Jahren 1966 und 1967 wiesen Sutherland und New unabhängig voneinander auf familiäre Häufungen eines Mineralocorticoidexzesses hin, der offenbar durch die Gabe eines Glucocorticoids kontrolliert werden konnte (Sutherland et al. Can Med Assoc J 1966, New MI et al. J Clin Endocrinol Metab 1967). Die Autoren schlussfolgerten, dass das klinische Erscheinungsbild und die auffälligen Laboranalysen möglicherweise mit einer durch Adrenocorticotropin (ACTH) gesteuerten Sekretion von Aldosteron in Verbindung stehen könnten. 26 Jahre später deckte Richard Lifton in seinen Studien die pathognomonische Gen-Aberration auf und lieferte damit die molekularbiologische Grundlage bestehender Vermutungen (Lifton et al. Nat Genet 1992): Ein fehlgeleitetes meiotisches Crossing-over zwischen den Genen der 11 β -Hydroxylase (*CYP11B1*) und der Aldosteronsynthese (*CYP11B2*) führt zu einer autosomal-dominant vererbten Hybridgenvariante *CYP11B1/B2*, die sich auf Chromosom 8q (Abschnitt 24.3) zwischen *CYP11B2* und *CYP11B1* eingliedert (Jackson et al. Ann N Y Acad Sci 2002). Sequenz-Analysen zeigen, dass die Bruchpunkte sehr häufig zwischen Intron 2 und Exon 3 des Fusionsgens liegen (Lee et al. J Korean Med Sci 2010). Hier ist allerdings eine größere Variabilität zu beobachten, weshalb interindividuelle Unterschiede in der Gensequenz auftreten können. Neben einem fehlgeleiteten Crossing-over werden auch Genkonversionen beschrieben, die mit einem nicht reziproken Austausch von genomischem Material der Chromatiden einhergehen, aber vermutlich nicht zum klinischen Erscheinungsbild eines FHA-I führen (Mulatero et al. JCEM 1998). Voraussetzung hierzu ist, dass *CYP11B1/B2* Exonsequenzen abwärts von Exon 5 des *CYP11B2*-Anteils enthält, um ein Enzym mit Aldosteronsynthese-Aktivität zu generieren (Macconnachie et al. JCEM 1998). Das Hybridgen unterliegt durch Promoteranteile von *CYP11B1* den Regulationsmechanismen der 11 β -Hydroxylase. Als Schlüsselenzym des Cortisol-Stoffwechsels weist der *CYP11B1*-Promoter Bereiche auf, die mit ACTH-abhängigen Transkriptionsfaktoren interagieren und hierüber die Genexpression regulieren (s. Kapitel 1.2). Durch den Austausch der Promotoren stimuliert das Hypophysenhormon Adrenocorticotropin nun mehr die Expression einer abgewandelten Aldosteronsynthese. Hierdurch obliegt die Aldosteronsekretion einer zirkadianen Rhythmik und wird von ihren physiologischen Stimuli abgekoppelt. Die Regulation durch das Renin-Angiotensin-System tritt außer Kraft, die funktionelle Nebennierenrindenzonierung wird aufgehoben. Ein primärer Hyperaldosteronismus mit einer Aldosteronsynthese in den *Zonae fasciculata* (zF) und *reticularis* (zR) ist die Folge (Halperin et al. Endocrinol Metab Clin North Am. 2011). Die Physiologie der Aldosteronsekretion und molekulare Grundlagen zur Genregulation von Aldosteronsynthese und 11 β -Hydroxylase werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

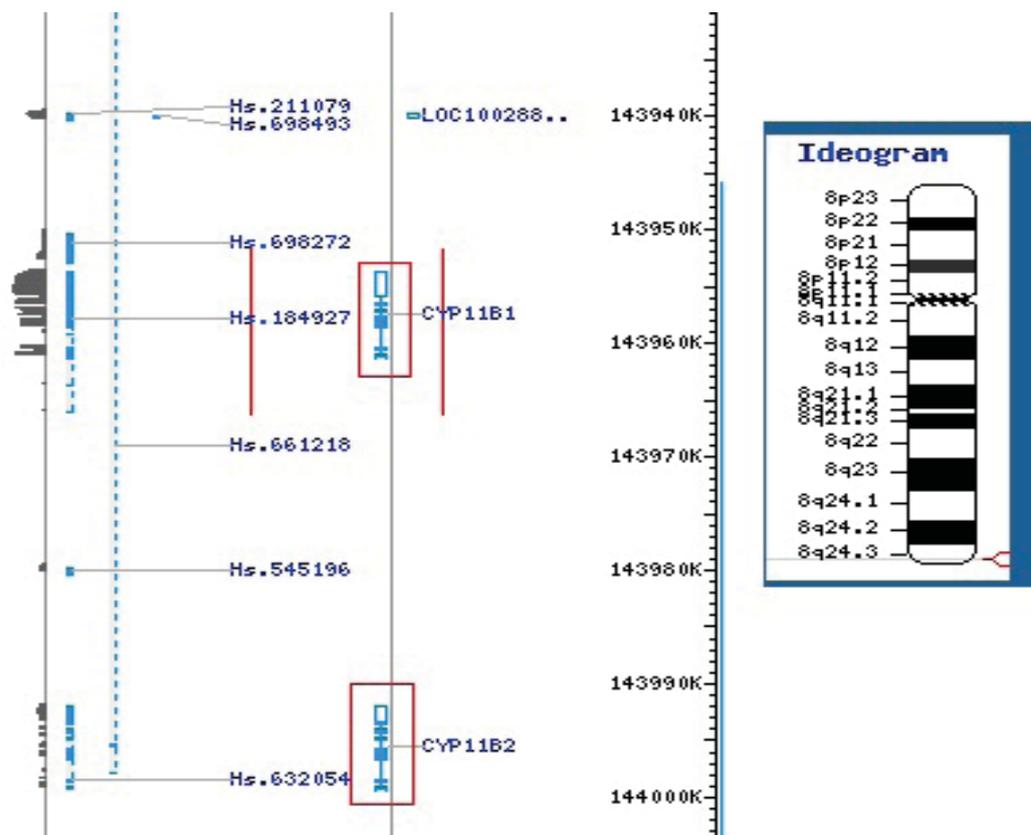


Abb. 1 Lokalisation der Gene *CYP11B1* und *CYP11B2* auf Chromosom 8q. Ausschnitt aus der Region 8q24.3. Die ausgeprägte Genhomologie und die Lokalisation machen diese Steroid-Hydroxylase-Gene anfällig für interchromatidalen Austausch (Quelle: pubmed.com).

1.2 Übersicht über die Regulation der *CYP11B1*- und *CYP11B2*-Expression

Das Nebennierenrinden-Hormon Aldosteron ist ein wirkungsstarkes Mineralocorticoid. Es spielt eine zentrale Rolle in der Salz-Wasser-Homöostase und beeinflusst Volumenhaushalt und Blutdruck. Unter physiologischen Umständen wird es ausschließlich in der *Zona glomerulosa* (zG) der Nebennierenrinde synthetisiert. Mitochondriale *steroid acute regulatory* (STAR)-Proteine sind an den ersten Regulationsschritten der Aldosteronsynthese beteiligt und organisieren den Transport von Cholesterin zur Mitochondrienmembran (Miller et al. Endocr Dev 2008). Als Schlüsselenzym katalysiert die Aldosteronsynthese die β -Hydroxylierung an C₁₁ sowie die Hydroxylierung und Oxidation an C₁₈ des 11-Desoxycorticosterons. Angiotensin-II und extrazelluläre Kaliumionen hemmen die Repolarisation der Zellen in der zG und erhöhen den transmembranösen Ca²⁺-Strom (Spät et al. Physi-

ol Rev 2004). AT1-Rezeptoren (AT1R) führen zur Aktivierung des Calcium/Calmodulin-Signalweges, dem eine besondere Bedeutung in der Regulation der *CYP11B2*-Expression zukommt (Bassett et al. Mol and Cell Endocr 2004, s. Abb. 2). Hemmend auf die Aldosteronsynthese wirken das atriale natriuretische Peptid (ANP) (Porzionato et al. Int Rev Cell Mol Biol 2010), eine Hypernatriämie (Mulrow, Regul Pept 1999) und Dopamin (Carey, JCEM 1982). Östrogene senken die plasmatische Reninkonzentration, die Aktivität des Angiotensin-konvertierenden-Enzyms (ACE), sowie die Expression der AT1-Rezeptoren. Progesteron wirkt auf Ebene des Mineralocorticoid-Rezeptors antagonistisch zu Aldosteron. Die Ausprägung eines Hyperaldosteronismus bessert sich daher häufig in der Schwangerschaft, wobei die Inzidenz des Conn-Syndroms in der Menopause steigt (Komukai et al. Fundam Clin Pharmacol 2010). Die ebenfalls mineralocorticoid wirkenden Glucocorticoide Cortisol und Corticosteron werden in den Zielzellen des Aldosterons größtenteils über die 11β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu inaktivem Cortison bzw. Dehydrocorticosteron abgebaut (Bailey et al. J Am Soc Nephrol 2008). Aldosteron bindet unter anderem im Sammelrohr der Niere an den Mineralocorticoid-Rezeptor (MR) und reguliert über ein *hormone response element* die Expression der *serum and glucocorticoid-inducible kinase 1*. Diese Kaskade führt zur Stabilisierung des epithelialen Natriumkanals (ENaC), des *renal outer medullary potassium channel* (ROMK) sowie der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase. Folge ist eine gesteigerte Rückresorption von Natrium, die im Austausch gegen Kaliumionen und Protonen stattfindet.

Die codierenden Abschnitte der Gene *CYP11B1* und *CYP11B2* weisen 95 % homologe Sequenzen auf (Pascoe et al. Proc Natl Acad Sci 1992). 11β -Hydroxylase und Aldosteronsynthase gelten daher als Isoenzyme, deren Aminosäuresequenzen sich zu ca. 93 % gleichen (Mornet et al. J Biol Chem 1981). Dennoch bestehen deutliche Unterschiede in Regulation, Katalyse und Expressionsmuster (Imachi et al. Biochem Biophys Res Commun 2008). Während die Aldosteronsynthase die Umwandlung von 11-Desoxycorticosteron in Aldosteron katalysiert, hydroxyliert die 11β -Hydroxylase 17α -Hydroxyprogesteron an C_{11} zu 21-Desoxycortisol oder 11-Desoxycortisol an C_{11} zu Cortisol (Bassett et al. Mol and Cell Endocrinol 2004). Beide Enzyme sind Schlüsselenzyme, deren zelluläre Koexistenz in zF und zR zu einer Fehlregulation der Steroid-Biosynthese führen würde: In zF-Zellen ist die Progesteron-Konzentration als gemeinsame Vorstufe der Steroidhormone um ein Vielfaches höher als in zG-Zellen, so dass hier die Expression von *CYP11B2* zwangsläufig einen Mineralocorticoidexzess zur Folge hätte (Beispiel FHA-I). Eine differenziert regulierte Hormonsynthese unter gleichzeitiger Stimulation von ACTH und Angiotensin-II wäre nur begrenzt möglich, da beide Enzyme um dieselben Substrate konkurrieren. Dort, wo ACTH-Rezeptoren (Gen: *MC2R*) gegenüber AT1-Rezeptoren überwiegen, verschiebt sich das intrazelluläre Gleich-

gewicht der *second-messenger* in Richtung cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Proteinkinase A (PKA) (Bassett et al. Mol and Cell Endocrinol 2004). Dieses Verteilungsverhältnis findet sich in zF und zR (Reincke et al. J Endocrinol 1998, Schuberth et al. Clin Endocrinol 2001). Die Expression der Aldosteronsynthese wiederum wird hauptsächlich über den Calcium/Calmodulin-Signalweg reguliert (Shen et al. Endocrinology 1997). Die Steuerbarkeit dieser Kaskade durch Angiotensin-II und Kalium setzt eine besondere Zusammensetzung von Membranrezeptoren und Transportern (AT1R, TASK 1/3) voraus (Brenner et al. Am J Physiol Endocrinol Metab 2008). Elektrophysiologisch führen TASK-Kanäle bei einem Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration zur Depolarisation der Zellmembran (Abb. 2). Angiotensin-II unterstützt die Verminderung des transmembranösen Kaliumflusses durch Hemmung der repolarisierenden TASK-Kanäle. Beides führt zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Diese Konstellation transmembranöser Rezeptoren ist unter physiologischen Umständen spezifisch für zG-Zellen. Hier überwiegen AT1-Rezeptoren gegenüber ACTH-Rezeptoren (Schuberth et al. Clin Endocrinol 2001). Weil der Calcium/Calmodulin-Signalweg den cAMP/PKA-Signalweg effektiv hemmt, verschiebt sich hier das intrazelluläre Gleichgewicht der *second-messenger* in Richtung Calcium/Calmodulin.

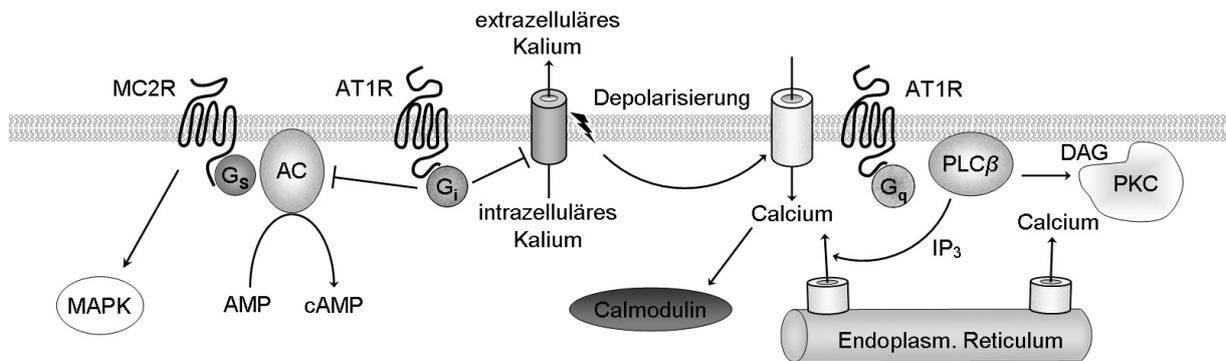


Abb. 2 Schematische Übersicht ausgewählter Signalwege einer Nebennierenrinden-Zelle. Abk.: MC2R: ACTH-Rezeptor, AT1R: Angiotensin-II-Rezeptor 1, MAPK: *mitogen activated protein kinase*, AC: Adenylatzyklase, G_s : stimulatorisches G-Protein, G_i : inhibitorisches G-Protein, PLC: Phospholipase C, DAG: Diacylglycerin, IP_3 : Inositoltriphosphat (Abbildung aus Dringenberg et al. Horm Metab Res 2013)

1.2.1 *Steroidogenic factor 1*

Der cAMP/PKA-Signalweg induziert Transkriptionsfaktoren, die stimulierenden Einfluss auf Gene der Glucocorticoidsynthese haben (Denner et al. Mol Cell Endocrinol 1996). Aufgrund der Homologie von *CYP11B1*- und *CYP11B2*-Promotoren ist die Regulation dieser beiden Gene äußerst komplex. Eine besondere Rolle spielt in diesem Zusammenhang der Promoterbereich *Ad4*, der mit dem Transkriptionsfaktor *steroidogenic factor 1* (SF-1) interagiert (Wang et al. Endocrinology 2000) und hierüber einen stimulierenden Einfluss auf die Expression des *CYP11B1*-Gens ausübt (Winnay et al. Mol Endocrinol 2006). Nicht nur die Expression der 11β -Hydroxylase, sondern auch die der 17α -Hydroxylase und des ACTH-Rezeptors selbst werden durch SF-1 stimuliert. Erstaunlicherweise steht *CYP11B2* nicht unter stimulierendem Einfluss von SF-1. Obwohl sich in der Promotersequenz von *CYP11B2* *Ad4*-homologe Bereiche befinden, führen wenige Polymorphismen zu einem inhibitorischen Einfluss von SF-1 (Ouyang et al. J Endocrinol Invest 2011, s. Abb. 4). So zeigt beispielsweise eine Expressionsanalyse transforzierter Nebennierenzellen (H295) mit einer dominanten Negativ-Mutante des SF-1-Proteins, dass die ACTH-abhängige Stimulation von *CYP11B1* deutlich eingeschränkt ist. Auf die Expression der Aldosteronsynthase hat dies allerdings keinen Einfluss (Bassett et al. J Mol Endocrinol 2002). Zusammenfassend gilt: Bei einer Verminderung der intrazellulären SF-1-Konzentration steigt das *CYP11B2*/*CYP11B1*-Expressionsverhältnis (Li et al. J Steroid Biochem Mol Biol 2004).

Zur Interaktion mit dem Promoterbereich *Ad4* benötigt SF-1 die Cofaktoren SRC1 und CBP (Sirianni et al. J Cell Sci 2010). Angiotensin-II kann diese Interaktion verhindern: Es aktiviert durch Bindung an den AT1R die Proteinkinase C (PKC), die wiederum über extrazellulär regulierbare Kinasen (ERK1/2) die Aktivität des c-FOS-Proteins steigern kann (Bassett et al. Mol Cell Endocrinol 2004, Rincon et al. Endocrinology 2009). c-FOS verhindert die Interaktion von SF-1 mit SRC1/CBP und führt hierüber zu einer Inhibition der SF-1-abhängigen *CYP11B1*- und *CYP17* Expression (Sirianni et al. J Cell Sci 2010). Immunhistochemische Analysen deuten auf eine inverse Korrelation zwischen dem zellulären Gehalt an c-FOS und 17α -Hydroxylase in der zG hin. Zusammenfassend gilt: Bei einer Erhöhung der intrazellulären c-FOS-Konzentration steigt das *CYP11B2*/*CYP11B1*-Expressionsverhältnis.

Im Gegensatz zur PKC begünstigt die durch ACTH aktivierte *mitogen activated protein kinase* (MAPK) die Interaktion von SF-1 mit seinem Cofaktor SRC-1 (Le et al. Endocrinology 2001) und hierüber die Expression *CYP11B1* (Bassett et al. J Mol Endocrinol 2002). Der MC2R-Signalweg stimuliert über diese Mechanismen die Cortisol-, der AT1R-Signalweg

die Aldosteronbiosynthese. Als Mediator beeinflusst SF-1 hierbei maßgeblich das *CYP11B2/CYP11B1*-Expressionsverhältnis und die damit verbundene zelluläre Tendenz zur Synthese von Cortisol oder Aldosteron. SF-1 gilt als einer der wichtigsten Regulatoren der differenzierten Steroidbiosynthese.

Die Aktivität und Spezifität von SF-1 als Transkriptionsfaktor hängt neben der Interaktion mit seinen Cofaktoren auch von einer komplex gesteuerten, posttranslationalen Modifikation ab (Kramer et al. J Biol Chem 1984). Die PKA und die PKC sind an der direkten Phosphorylierung von SF-1 nicht beteiligt. Hierzu sind folgende Kinasen notwendig: Sowohl der CDK-aktivierte Kinase-Komplex (CAK) als auch ERK1/2 phosphorylieren SF-1 direkt (Lewis et al. Mol Endocrinol 2008, Hammer et al. Mol Cell 1999). ERK1/2 modifiziert mit c-FOS und SF-1 somit zwei Zielproteine, die stellenweise antagonistische Wirkung auf die Expression verschiedener Steroidhydroxylase-Gene haben. Die mitogen aktivierte Kinase/Phosphatase 1 (MKP1) dephosphoryliert ERK1/2 und kann hierüber die Phosphorylierung von SF-1 verringern (Winnay et al. Mol Endocrinol 2006). Der Phosphorylierungsgrad von SF-1 modifiziert seine Wirkung auf Genebene: Dephosphoryliertes SF-1 scheint die Expression von *CYP17* zu stimulieren (Sewer et al. J Biol Chem 2003), phosphoryliertes SF-1 hingegen die Expression von *MC2R* (Winnay et al. Mol Endocrinol 2006). Als übergeordnete Regulatoren dieser komplexen Mechanismen kommen möglicherweise Wachstumsfaktoren aus adrenalem Endothel und Stützgewebe in Betracht, die Einfluss auf die posttranslationale Modifikation nehmen und somit auf lokaler Ebene die zelluläre Tendenz zur differenzierten Genexpression mitsteuern könnten (Ansurudeen et al. Mol Cell Endocrinol 2007, Willenberg et al. Horm Metab Res 2008).

1.2.2 *cAMP response elements*

Die durch den AT1R stimulierte Calmodulin Kinase 1 phosphoryliert die Transkriptionsfaktoren *cAMP response element binding protein* (Condon et al. Endocrinology 2002, Sackmann et al. Horm Metab Res 2011), *activator transcription factor 1/2* und *CRE modulator* und leitet damit die Assoziation dieser Faktoren mit dem *cAMP response element* des *CYP11B2*-Promoters ein. Hierdurch wird die Genexpression von *CYP11B2* stimuliert (Matthews et al. Mol Cell Biol 1994, Nogueira et al. Endocrinology 2010). Eine schematische Übersicht hierüber wird in Abbildung 3 dargestellt.

Die Promoterregion von *CYP11B1* verfügt über einen *cAMP response element*-ähnlichen Promoterbereich, der als Ad1-Region bezeichnet wird und die Transkription von *CYP11B1* reguliert (Wang et al. Endocrinology 2000). Auch die ACTH-abhängige PKA phosphory-

liert die Transkriptionsfaktoren *activator transcription factor 2* (ATF-2) und *CRE modulator* (CREM), was zu einer Assoziation mit Ad1 führt. Auf den ersten Blick erscheint an dieser Stelle die Regulation beider Enzyme sehr ähnlich. Die *CYP11B2*-spezifische Interaktion von ATF-2 mit einem dritten Regulationssystem macht dieses auf den ersten Blick ähnliche erscheinende Prinzip zugänglich für Veränderungen des Verhältnisses von MC2R und AT1R (s. 1.2.3).

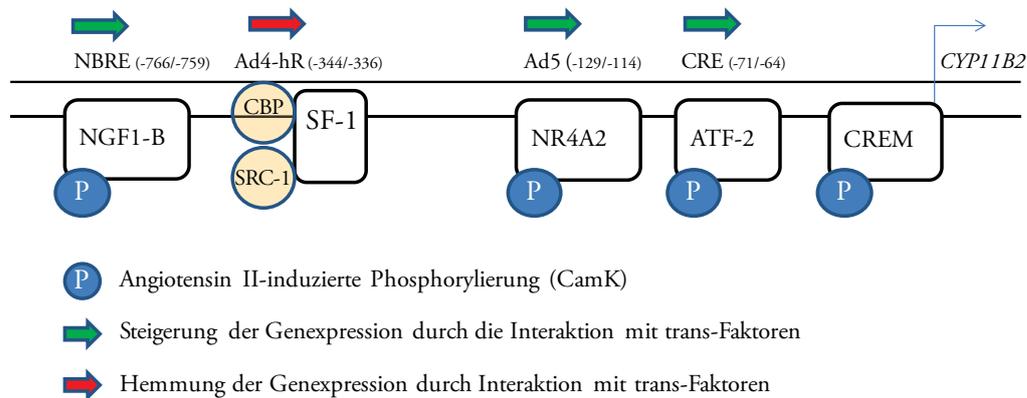


Abb. 3 Darstellung ausgewählter Bereiche des Promotors von *CYP11B2*. Abk.: CamK: Calmodulin-Kinase, NGFI-B: *neuronal growth factor-induced clone B*, NBRE: *NGFI-B response element*, SF-1: *steroidogenic factor 1*, ATF-2: *activator transcription factor 2*, SRC1: *steroid receptor coactivator-1*, CBP: *CREB binding protein*, CRE(M): *cAMP response element (modulator)*, Ad4-hr: Ad4-homologe Region

1.2.3 Neuronal growth factor-induced clone B

Für die spezifische *CYP11B2*-Expression in zG-Zellen spielen Transkriptionsfaktoren aus der *neuronal growth factor-induced clone B* (NGFI-B)-Familie eine entscheidende Rolle (Wilson et al. Science 1991). Studien zeigen, dass die hierzu zählenden Transkriptionsfaktoren NR4A1-3 spezifisch die *CYP11B2*-Expression über ein *NGFI-B response element* (NBRE) stimulieren können (Bassett et al. Mol Endocrinol 2004). NGFI-B Promotoren wiederum beinhalten eine sogenannte *AP-1 site*, die CREB und JunD binden (Inaoka et al. Mol Reprod Dev 2008). Angiotensin-II und Kalium wirken als potente Stimulatoren der NGFI-B Expression (Bassett et al. Mol Endocrinol 2004), wobei die mRNA von NR4A2 am stärksten stimuliert wird (Romero et al. Physiol Genomics 2007). Die Interaktion zwischen den Promoterbereichen CRE, Ad1 und NBRE stellt sich folgendermaßen dar:

Der Transkriptionsfaktor NR4A2 als Teil des NBRE-Systems interagiert mit dem Transkriptionsfaktor ATF-2 als Teil des CRE/Ad1 Systems (s.1.2.2). So führen Mutationen im NBRE einerseits zur Inhibition der *CYP11B2*-Expression, andererseits zu einem Abfall der ATF-2-Effekte (Nogueira et al. Endocrinology 2010). Der stimulierende Synergismus der cis-Elemente NBRE und CRE, vermittelt durch NR4A2 und ATF-2, erfordert seinerseits die Aktivität der CamK, um stimulierend auf die *CYP11B2*-Expression einzuwirken (Nogueira et al. J Mol Endocrinology 2009). Fehlt diese, dominiert das hemmende, SF-1 bindende Ad4-homologe Element (s. Abb. 3). Die Wechselwirkung von ATF-2 mit NR4A2 sensibilisiert das CRE/Ad1-System für Veränderungen der Rezeptorzusammensetzung. So wird die Expression von *CYP11B2* über einen weiteren Mechanismus abhängig von Angiotensin-II.

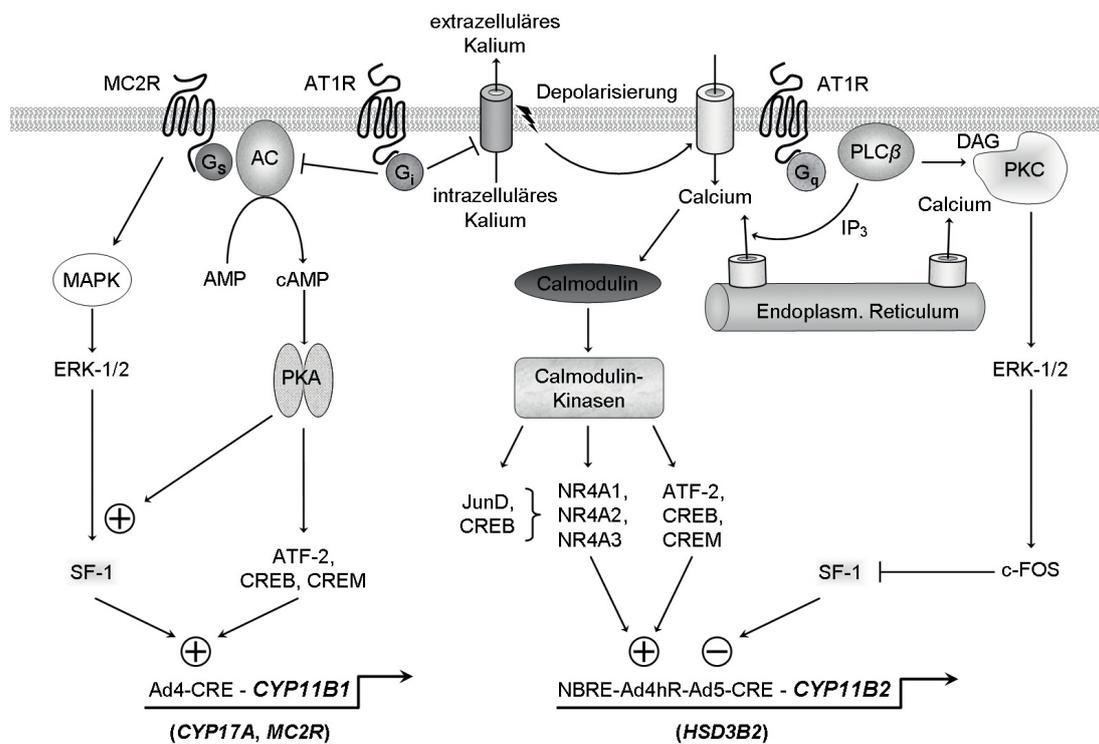


Abb. 4 Schematische Übersicht ausgewählter Signalwege einer Nebennierenrinden-Zelle unter Einbeziehung wichtiger Effektorproteine und Transkriptionsfaktoren. (Abbildung aus Dringenberg et al. Horm Metab Res 2013, Abk.: siehe Text und Abkürzungsverzeichnis)

Die Rezeptor-Zusammensetzung der Zelle spielt somit eine entscheidende Rolle, um eine funktionelle Nebennierenrindenzonierung zu ermöglichen (s. auch Diskussion). Unter physiologischen Bedingungen sind die Regulationsmechanismen differenziert abgestimmt, so

dass das *CYP11B2/CYP11B1*-Expressionsverhältnis zwischen den Zonen variiert. Auf diese Weise wirkt die Nebennierenrinde als Syntheseort zweier lebenswichtiger Hormonsysteme, die sich nicht nur in der Regulation, sondern auch in ihren Aufgaben für den Gesamtorganismus deutlich voneinander unterscheiden. Die Hybridgenvariante *CYP11B1/B2* macht die abgewandelte Aldosteronsynthese unter anderem sensibel für den stimulierenden Einfluss des Transkriptionsfaktors SF-1. Folge ist eine Entkopplung der strikt getrennten Synthese-Bezirke. Die Aldosteronsynthese findet somit auch in Zellen statt, in denen die 11β -Hydroxylase exprimiert wird. Die Angiotensin-II abhängige Wildtyp-Variante wird nicht exprimiert, da das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System auf primärer Ebene supprimiert ist. Hohe Konzentrationen der Hybridsteroiden 18-Hydroxycortisol und 18-oxo-Cortisol in Blut und Urin können nicht nur diagnostisch herangezogen werden, sondern sind auch Ausdruck der zellulären Koexpression von 11β -Hydroxylase, Aldosteron-Synthase und 17α -Hydroxylase (Jackson et al. Ann N Y Acad Sci 2002). Mittlerweile sind weitere Formen des primären Hyperaldosteronismus bekannt, die ebenfalls zu einem messbaren Anstieg der Hybridsteroiden führen (Choi et al. Science 2011). Ursächlich liegen Mutationen im *KCNJ5*-Gen vor, die zu einer gesteigerten Depolarisationsneigung der zG-Zellen führen. Als Keimbahnmutation wird dies als Familiärer Hyperaldosteronismus Typ 3 (FHA-III), als somatische Mutation möglicherweise als Aldosteron-produzierendes Adenom manifest. Die gesteigerte Aldosteronsekretion führt zu einer Suppression des RAAS, was sekundär zu einem Wegfall der AT1R-gekoppelten Hemmung des MC2-Rezeptors und zu einer zellulären Koexpression von *CYP11B1* und *CYP11B2* führt (Choi et al. Science 2011, Späth et al. Eur J Endocrinol 2011, Åkerström et al. PLoS One 2012).

1.3 Ziel der Arbeit

Der Genotyp von Patienten, die an einem Familiären Hyperaldosteronismus Typ 1 erkrankt sind, erlaubt einen medikamentösen Therapieansatz, der einzigartig in der Behandlung des Conn-Syndroms ist. Die Suppression des ACTHs durch eine niedrig dosierte Gabe von Dexamethason reguliert effektiv die Mineralocorticoid-Hypertonie und macht den Einsatz gängiger Antihypertensiva in der Regel überflüssig. Hierbei kann unter anderem auf eine dauerhafte Gabe von Spironolacton verzichtet werden, was insbesondere im Hinblick auf mögliche Langzeit-Nebenwirkungen wie die Entwicklung einer Gynäkomastie, Dysmenorrhoe oder eines Hypogonadismus für die Patienten von Vorteil ist. Durch eine zuverlässige Detektion der pathognomonischen Hybridgen-Variante können Risikopatienten (s. Diskussion) frühzeitig identifiziert werden und hierdurch langfristig von einem optimalen Therapiekonzept profitieren. Dieses sieht neben der medikamentösen Therapie unter anderem auch eine zielgerichtete humangenetische Aufklärung vor. Der Funktionsbereich Spezielle

Endokrinologie (Ärztlicher Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott) des Universitätsklinikums Düsseldorf betreut im Rahmen der ambulanten und stationären Versorgung eine Vielzahl von Patienten mit einem primären Hyperaldosteronismus. Neben den routinemäßigen Verlaufskontrollen wird unter Berücksichtigung aktueller Leitlinien (s. 1.1.1) die Diagnostik und Therapieeinleitung bei Patienten mit Verdacht auf einen primären Hyperaldosteronismus angeboten. Hierbei besteht eine enge Zusammenarbeit mit der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. T. Knoefel).

Ziel dieser Arbeit ist die Klärung der Frage, wie häufig ein FHA-I in der Düsseldorfer Kohorte (s. 2.1) vorkommt. Hierzu wird ein PCR-basiertes Assay zur Detektion der Hybridgen-Variante etabliert und auf ein ausgewähltes Patientenkollektiv angewendet. Um unabhängig von konserviertem Patientenmaterial auch in Zukunft über Testkontrollen zu verfügen, werden Teile der Gene *CYP11B2* und *CYP11B1/B2* in stabile Vektoren kloniert. Hierin unterscheidet sich der methodische Ansatz von den bisher publizierten Studien zur Prävalenzbestimmung des FHA-I, in denen überwiegend Patienten-DNA als Template für die Amplifikation der Positivkontrollen verwendet wurde (Mulatero et al. Hypertens 2011, Pizzolo et al. J Hum Hypertens 2005, Mckenzie et al. J Hum Hypertens 2000). In einigen Studien wurde der Einsatz von Testkontrollen gar nicht beschrieben (Strauch et al. J Hum Hypertens 2003, Lee et al. J Korean Med Sci 2010, Yokota et al. Hypertens Res 2001, Fardella et al. J Clin Endocrinol Metab 2000). Da der Vorrat an konserviertem Patientenmaterial sehr gering ist, kann die Klonierung der Zielgene vorhandene Verfügbarkeitslücken schließen und einen jederzeit einsetzbaren, sensitiven Bestätigungstest für Verdachtspatienten ermöglichen.

Unabhängig von der experimentellen Arbeit wird eine ausführliche Übersicht über die wichtigsten molekularen Regulationsmechanismen der *CYP11B1*- und *CYP11B2*-Expression auf zellulärer Ebene dargestellt (Kapitel 1.2). Ziel ist es, wichtige regulatorische Unterschiede an Schlüsselpunkten der Cortisol- und Aldosteronsynthese aufzuzeigen, was für das Verständnis der Nebennierenrindenfunktion und des FHA-I unerlässlich ist. In der abschließenden Diskussion werden die in Kapitel 1.2 dargestellten Mechanismen in einen Gesamtzusammenhang gestellt und hieraus eine Hypothese zur funktionellen Entwicklung der Nebennierenrindenzonierung abgeleitet (Kapitel 4.2).

1.3.1 PCR, Klonierung von *CYP11B2*, Sequenzierung

In der ersten Arbeitsphase wird genomische DNA aus dem Vollblut eines gesunden Probanden isoliert. Die gewonnene DNA wird als Template einer Polymerase Kettenreaktion

zugeführt, mit der ein ausgewählter Bereich von *CYP11B2* amplifiziert wird. Das synthetisierte Amplikon wird nach der Addition eines Desoxyadenosin-Überhangs in einen Vektor ligiert, mit dem kompetente *E.coli* Bakterien transformiert werden. Im Anschluss an die Klonierung erfolgen Restriktionsverdau und Gelelektrophorese. Das Insert wird extrahiert und sequenziert. Da die ermittelte Sequenz dem zu Grunde liegenden *CYP11B2*-Abschnitt entspricht (s. Ergebnisse), kann das klonierte Insert in folgenden Schritten als Testkontrolle in der diagnostischen Umsetzung verwendet werden.

1.3.2 Klonierung des Hybridgens *CYP11B1/B2*

In der zweiten Arbeitsphase wird genomische DNA eines Patienten als Ausgangsmaterial verwendet, der in einem auswärtigen Zentrum bereits positiv auf das Vorliegen eines FHA-I getestet wurde (s. 2.1). Die Primerkombination wird dem Genmerkmal angepasst, so dass sämtliche bisher publizierten Bruchpunkte des fehlgeleiteten Crossing-overs mit erfasst werden. Die folgenden Arbeitsschritte sind deckungsgleich. Nach erfolgreicher Klonierung und deckungsgleicher Sequenzierung kann das Insert ebenfalls als Testkontrolle in der diagnostischen Umsetzung verwendet werden.

1.3.3 Diagnostische Umsetzung

In der diagnostischen Umsetzung werden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 61 ausgewählte Patienten mit arterieller Hypertonie auf das Vorliegen von *CYP11B1/B2* getestet. Zuvor werden Parameter wie Geschlecht, Lebensalter, mittlerer Blutdruck und ARQ erhoben und statistisch ausgewertet. In der diagnostischen PCR kommen *CYP11B2*- und *CYP11B1/B2*-spezifische Primerkombinationen zum Einsatz. Die patientenspezifischen Amplifikate werden mit Größenmarkern und den erstellten Kontrollen verglichen.

2.1 Patienten

In dieser Arbeit werden insgesamt 61 Patienten auf das Vorliegen eines Familiären Hyperaldosteronismus Typ 1 untersucht. 59 Patienten befanden sich zwischen 2008 und 2009 zur Abklärung sekundärer Hypertonieursachen in ambulanter und stationärer Behandlung der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie der Universitätsklinik Düsseldorf. Bei 33 dieser Patienten konnte ein primärer Hyperaldosteronismus klinisch und laboranalytisch nachgewiesen werden (Gruppe PA). Bei weiteren 26 Patienten wurde eine sekundäre Hypertonieursache ausgeschlossen, so dass hier von einer essenziellen Hypertonie ausgegangen werden kann (Gruppe HTN). Als blinde Testkontrollen werden zwei Patienten aus auswärtigen Zentren mit einbezogen, bei denen bereits im Vorfeld die Diagnose eines Familiären Hyperaldosteronismus Typ 1 gesichert werden konnte. In diesem Zusammenhang gilt Frau Dr. Dekomien aus dem Institut für Humangenetik der Ruhr-Universität Bochum (Vonend et al. *Nephrol Dial Transplant* 2007) sowie Herrn Dr. Egbert Schulze aus Heidelberg (Kamrath et al. *Horm Res Paediatrici* 2011) der Dank für die Bereitstellung der Proben. Eine dieser Proben diente als Matrix für die Klonierung der Positivkontrolle. Alle Patienten wurden über die Verwendung der Blutproben für Forschungszwecke und genetische Analysen aufgeklärt und haben ihr Einverständnis gegeben. Im Rahmen des Studienprotokolls „Deutsches Conn-Register: Multizentrische Datenerhebung zu Diagnostik, Therapie und Krankheitsverlauf des Conn-Syndroms“ besteht ein positives Votum der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studiennummer: 3027).

Für die statistische Auswertung der gesammelten klinischen und laboranalytischen Parameter wird das Programm Prism 4.03 (GraphPad, La Jolla, USA) verwendet. Zur Ermittlung der Signifikanzwerte wird bei normalverteilten Werten der t-Test, bei nichtparametrischen Werten der Mann-Whitney-Test sowie der Chi-Quadrat-Test verwendet.

2.2 Reagenzien und Enzyme

Reagenzien/Enzyme

Agarose	Invitrogen
Bovine serum albumine 100×	NEB
Crystal Violet	Invitrogen
Crystal Violet Loading Dye	Invitrogen
DEPC treated water	Invitrogen
DNA molecular weight marker VII	Roche
DNA molecular weight marker X	Roche
dNTP Mix 10 mM	Promega
Ethanol absolut	Merck
Ethidium Bromid	Sigma
EZ Mix Tryptone	Sigma
Gel Loading Solution, Type I	Sigma
HCL 1 mol/l	Merck
Kanamycin A Sulfate	Sigma
LB Agar	Invitrogen
MgCl ₂	Promega
NaOH	Merck
NE4 Puffer 10×	NEB
2-Propanol	Sigma
Select Yeast Extract	Sigma
Sodium Chloride	Merck
TAE Puffer 10×	Promega
TE Puffer	Promega
Go Taq Polymerase	Promega
High Fidelity Enzym Mix	Roche
RNase	Qiagen
EcoRI	NEB
SapI	NEB

LB Medium

Trypton	1%
Yeast Extract	0,5%
NaCl	1%
Kanamycin A	50 µg/ml

LB Agar Platten

Trypton	1%
Yeast Extract	0,5%
NaCl	1%
Kanamycin A	50 µg/ml
LB Agar	15 g/l

2.3 Extraktion genomischer DNA aus Vollblut

Zur Isolation genomischer DNA eines gesunden Probanden werden im Rahmen einer Blutentnahme 2 ml Vollblut in EDTA-Blutentnahmeröhrchen gewonnen. Die Blutzellen werden in einem Protease-haltigen Puffer lysiert. Das Lysat passagiert während eines Zentrifugationsschrittes eine Silicamembran, die pH-abhängig doppelsträngige DNA bindet. Rückstände der Blutbestandteile werden in zwei Waschungen entfernt und die gebundene DNA eluiert. Dabei wird auf den Einsatz von Phenol oder Chloroform verzichtet. Zur Anwendung kommt das QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen, Germany, Hilden). Die aufgereinigte DNA wird photometrisch auf Reinheit und Konzentration geprüft.

Anwendung

Jeweils 200 µl QIAGEN Protease und 2 ml Vollblut werden in 15 ml Falcontubes pipettiert und kurz geschüttelt. Zu den Ansätzen werden jeweils 2,4 ml Puffer AL pipettiert und bis zum Entstehen einer homogenen Lösung geschüttelt. Das Lysat wird für 10 min bei 70° C inkubiert. Nach der Inkubation werden 2 ml Ethanol (96-100%) zugegeben und 1 Minute kräftig geschüttelt. Die Hälfte der Lösung wird auf eine QIAamp Midi column gegeben und für 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die verbleibende Hälfte auf die Säule gegeben. Die Waschungen erfolgen durch Zugabe von jeweils 2 ml der Puffer AW 1 und AW 2. Zentrifugiert wird für 15 Minuten bei 5000 rpm. Die Elution der DNA erfolgt mit *DEPC treated water*. Reinheit und Konzentration der DNA werden photometrisch bestimmt (s. 2.4).

2.4 Photometrische Transmissionsmessung (Prinzip)

Die Zusammensetzung einer Flüssigkeit beeinflusst die Absorption durchstrahlender Photonen. Die Messung der Transmission erlaubt Aussagen über die Konzentration eines definierten Stoffes. Dabei besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Stoffkonzentration und dem negativ dekadischen Verhältnis aus transmittierter und einfallender Lichtintensität. Der Proportionalitätsfaktor wird als spektraler Absorptionskoeffizient bezeichnet, der bei gegebener Wellenlänge eine Substanz-spezifische Größe darstellt. Dieses Gesetz nach Lambert-Beer lässt sich in der folgenden Gleichung zusammenfassen:

$$E_{\lambda} = -\lg (I_1/I_0) = \varepsilon_{\lambda} * c * d$$

E: Extinktion, ε : Extinktionskoeffizient, c : Konzentration, d : Schichtdicke der Küvette, I : Transmission

Die Konzentration doppelsträngiger DNA wird photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm in einer Quarzküvette (50-2000 μl , Eppendorf) bestimmt. Dabei entsprechen 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doppelsträngiger DNA bei pH 7,0 einer optischen Dichte von 1. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt bei einer Wellenlänge von 280 nm. Das Verhältnis OD260/OD280 gibt Auskunft über die Verunreinigung durch Proteine. Ein Verhältnis von 1,8 spricht für eine reine DNA-Isolierung. Liegt der Qualitätskoeffizient unter 1,8, ist die Präparation mit Protein oder aromatischen Substanzen (z.B. Phenol) kontaminiert. In diesem Fall muss die DNA erneut gereinigt werden.

2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Grundprinzip: Die Polymerase Kettenreaktion ist eine Methode zur selektiven DNA-Vervielfältigung. In dieser Arbeit wird sie zur Amplifizierung ausgewählter Bereiche der Gene *CYP11B2* und *CYP11B1/B2* verwendet. Thermostabile DNA-Polymerasen ermöglichen die zyklische Synthese von DNA-Fragmenten, die komplementär zu einem durch DNA-Sonden (Primer) flankierten Bereich einer Template-DNA konfiguriert sind. Voraussetzung ist die Etablierung eines Thermoprofils, das individuell auf Enzymzusammensetzung, Fragmentlänge und Primerkonfiguration abgestimmt ist. Der PCR Zyklus umfasst drei Schritte. Zu Beginn wird das Reaktionsgemisch auf über 90° Celsius erhitzt, um eine Denaturierung der doppelsträngigen Template-DNA zu erzielen. Im nächsten Schritt erfolgt die Hybridisierung der Primer (Annealing). Die dafür notwendige Temperatur orientiert sich an den Schmelztemperaturen der ca. 20 bp langen DNA-Moleküle und liegt in den meisten Fällen zwischen 50° C und 62° C. Zu niedrige Temperaturen erhöhen das Risiko einer Fehlhybridisierung, insbesondere bei hoch homologen Genen wie *CYP11B1* und *CYP11B2*. Die individuelle Gestaltung der Primersequenz ist Voraussetzung für die Amplifizierung eines zuvor ausgewählten Bereiches, da die Hybridisierungspositionen Start- und Endpunkt der DNA-Polymerisierung markieren (s. unten). Der dritte Schritt umfasst die DNA-Synthese. DNA-Polymerasen katalysieren den nukleophilen Angriff des 3'-Hydroxylrestes des endständigen Nukleosidmonophosphates auf das α -Phosphat der dNTP-Substrate unter Bildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung. Das Temperaturoptimum der Polymerasen liegt zwischen 68° C und 72° C. Da Primer grundsätzlich als Startpunkt fungieren, findet in den ersten Thermozyklen die Synthese überlanger DNA-Stränge statt, prinzipiell bis zum ersten Molekülbruch. In den folgenden Zyklen nimmt die Anzahl der gewünschten Fragmente jedoch exponentiell zu, da die Primer immer häufiger an die synthetisierten Amplifikate binden, deren 3'-Enden keinen Molekülbruch, sondern den Anfangspunkt des vorherigen Syntheszyklus darstellen. In dieser Arbeit kommt das Expand High Fidelity PCR System (Roche,

2 Patienten, Material und Methoden

Indianapolis, USA) zur Anwendung. Dieses System ist für die Amplifizierung großer DNA-Fragmente bis zu 5 kb optimiert. Neben der traditionell aus *Thermophilis aquaticus* isolierten Polymerase (Taq Polymerase) wird der Enzymmix mit einer aus Pyrococcus-Stämmen gewonnenen Polymerase (Tgo Polymerase) ergänzt, deren 3'-5'-Exonuclease-Aktivität die Inkorporation nicht komplementärer Basen reduziert. Die Syntheserate beträgt laut Hersteller 1,5 kb/min.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer richten sich nach der von Jonsson et al. beschriebenen PCR (Jonsson et al. Biochem Biophys Res Commun 1996). Alle bisher publizierten Bruchpunktstellen des Hybridgens werden durch die PCR erfasst. Primer 1 bindet als *forward-Primer* an einen *CYP11B1*-Genlocus. Analog hybridisiert Primer 2 als *forward-Primer* an einen äquivalenten, aber nicht homologen Bereich von *CYP11B2*. Primer 3 bindet als *reverse-Primer* an eine spezifische Sequenz von *CYP11B2*. Es hat sich eine annealing-Temperatur von 61 ° C etabliert.

Primer 1 (*CYP11B1fw*) 5' - TCA TGC ACC CCC AAT GAG TCC CTG - 3'

Primer 2 (*CYP11B2fw*) 5' - TCC TTC ATC TAC CTT TGG CTG GGG - 3'

Primer 3 (*CYP11B2rv*) 5' - GAG TCC TCC AGC TGC CTC TCA ACC - 3'

Nach der Datenbank *Gene Bank*[®] hybridisiert Primer 1 an Nucleotidposition 4848-4871 von *CYP11B1* (NG_007954), Primer 2 an Nucleotidposition 4843-4866 und Primer 3 an Nucleotidposition 8904-8927 von *CYP11B2* (NG_008374). Die Sequenz von Primer 3 wird komplementär in 3'-5' -Richtung gelesen, um die Nucleotidposition in dem unten abgebildeten Genabschnitt zu identifizieren:

CYP11B1:

4681	aatacatgtg	gtttaataca	attcatgcca	actcattccc	tcgttttttg	ctataaacct
4741	tgcaaggaga	tgaataatcc	aaggctcttg	gataagataa	gggccccatc	catcttgctc
4801	ctctcagccc	tggaggagga	gggagagtcc	ttttcccctg	tctacgctca	tgccccca
4861	atgagtcctt	gcctccagcc	ctgacctctg	ccctcggctt	ctcaggcaga	tccagggccca
4921	gttctcccat	gacgtgatcc	ctctcgaagg	caaggcacca	ggcaagataa	aaggattgca
4981	gctgaacagg	gtggaggag	cattggaatg	gcactcaggg	caaaggcaga	ggtgtgcatg
5041	gcagtgcctt	ggctgtccct	gcaaagggca	caggcactgg	gcacgagagc	cgccccgggtc

2 Patienten, Material und Methoden

CYP11B2:

4621 tgtggtataa aaataaagtc tattaaaaga atccaaggct ccctctcatc tcacgataag
 4681 ataaagtccc catccatttt actcctctca gccctggaga aaggagaggc cagggtcccac
 4741 caccttccac cagcatggac cccagtgcca gacccacgc cttttctcag catcctcaga
 4801 ccagcaggac ttgcagcaat ggggaattag gcacctgact **tctccttcat** **ctaccttgg**
 4861 **ctgggggcct** ccagccttga ccttcgctct gagagtctca ggcaggtcca gagccagttc
 4921 tcccatgacg tgatatgttt ccagagcagg ttctgggtg agataaaagg atttgggctg
 4981 aacagggtgg agggagcatt ggaatggcac tcagggcaaa ggcagaggtg tgcgtggcag

CYP11B2:

8701 tgttgccctc agccttcccc ctctttgtt aagggatgag atttgcaggg gaggggaaat
 8761 gtgagctccc cctcacatga gactgagttt gcagttacct gtgtggggat ccatgctcca
 8821 ggctggaaga aagtggatg aggccttggg cacacagcag ctctgtcccc actggaagc
 8881 tctgggtgta caaggagaag **gaggggtgag** **aggcagctgg** **aggactccac** tgggcacct
 8941 tcccagtgtg cccggtcacc ttgggcccaga aatgtagatg catgggaggg cagggttgtg
 9001 gggaagacag cagcacaggc tccagccagt gcagaggggc ctgtgggtgc acagtgggga
 9061 gaactcaatg gaagcagagg gagctggggc tccagaactc cctggatgat gctgaggtgt

Unter Berücksichtigung der Hybridisierungsstellen ergeben sich folgende zu erwartende Amplifikate:

	Wildtyp	Hybridgen
Primerkombination	Erwartete Fragmentlänge	Erwartete Fragmentlänge
Primer 2 + Primer 3	4084 bp	4084 bp
Primer 1 + Primer 3	kein Amplikon	ca. 4000 bp

Anwendung

Die Ansätze werden wie folgt pipettiert:

Komponente	Volumen (in µl)	Konzentration
PCR grade Nucleotid	1	200 µM (pro dNTP)
Mix	1,2 (x2)	300 nM
PCR primer mix, 10×	variabel	250 ng
Template DNA*	Ad 25	

Komponente	Volumen (in µl)	Konzentration
Expand High Fidelity Enzym Mix	0,75	2,6 U
Expand High Fidelity Puffer 10× konzentriert, MgCl ₂	5	1× (1,5 ml MgCl ₂)
PCR grade water	19,25	

* Als Template DNA werden im weiteren Verlauf verwendet:

- genomische DNA eines gesunden Probanden
- genomische DNA eines Patienten mit FHA-I
- Plasmide pCR-XL-TOPO-*CYP11B2*, pCR-XL-TOPO-*CYP11B1/B2* (siehe 2.7)
- Inserts nach Restriktionsverdau
- genomische DNA der getesteten Patienten

Die auf Eis pipettierten Ansätze werden in einem DNase-, RNasefreien PCR SoftTube 0,2 ml Reaktionsgefäß gemischt, gevortext und 10 Sekunden bei 2500 rpm in einer Haereus Biofuge pico zentrifugiert.

Thermal Cycling:

Als Thermo Cycler kommt der Biometra T3 Thermocycler zum Einsatz. Etabliert hat sich folgendes Thermo-Profil:

Temperatur (in ° C)	Dauer	Anzahl der Zyklen
94	2 min	1
94	15 sek	
61	30 sek	
68	5 min 30 sek	20
94	15 sek	
61	30 sek	
68	5 min 45 sek	5
94	15 sek	
61	30 sek	
68	6 min	5
72	7 min	1
4	Unbegrenzt	

2.6 Addition eines Desoxyadenosin-Überhanges

Der für die Transformation verwendete Vektor pCR-XL-TOPO liegt als linearisiertes DNA-Fragment mit Desoxythymidin haltigen sticky-ends vor. Voraussetzung für eine effektive TA-Klonierung und Zirkularisierung des Ligationsvektors ist ein Desoxyadenosin-Überhang des amplifizierten PCR-Produktes. Die Eigenschaft der Taq-Polymerase, Fragmente mit einem Basenüberhang zu synthetisieren, schafft die Voraussetzung für das Prinzip der TA-Klonierung. Dabei besteht dieser Überhang zumeist aus einer unspezifischen Base, verhältnismäßig häufig jedoch auch aus einem Adenosinrest. Um die Wahrscheinlichkeit einer Adenosin-Addition zu erhöhen, hat sich die folgende Anwendung etabliert:

Anwendung

Nach der Amplifikation wird 1 U Taq Polymerase und 100 μ M Adenosin-tri-phosphat als Substrat zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Die Reaktionstubes werden 10 Minuten bei 72° inkubiert und im Anschluss bei -20° zwischengelagert. Bei längeren Lagerungszeiten wird ein gleiches Volumen phenol-Chloroform zugegeben, um eine Restaktivität der Polymerasen zu blockieren.

2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Grundprinzip: Nukleosid-Polymere liegen bei neutralem pH-Wert als vielfach negativ geladene Anionen vor, da die nicht veresterte Hydroxylgruppe der Phosphatgruppen als Protonen-Donator wirkt. Diese elektrochemische Eigenschaft erlaubt die Auftrennung verschieden langer DNA-Fragmente in einem Gleichspannungsfeld. Als variabler Widerstand wirkt das Molekülnetz eines Agarosegels, dessen Konzentration die Flusstärke strömender Anion-Polymere bestimmt. Dabei besteht ein antiproportionaler Zusammenhang zwischen der Flusstärke und dem Logarithmus des Molekulargewichtes, sofern sich das Polymer nicht längs zum elektrischen Feld ausrichtet und der Gel-Widerstand dadurch stark abnimmt. Um Schäden an den Amplifikaten zu reduzieren, wird in dieser Arbeit auf ein traditionell mit Ethidiumbromid versehenes Agarose-Gel verzichtet, sofern die DNA in weiteren Arbeitsschritten für die Klonierung der Testkontrollen verwendet wird. Die bei UV-Exposition entstehenden Thymin-Dimere verringern signifikant die Effizienz der Klonierung. Deshalb kommt das Färbungsreagenz Crystal Violet zum Einsatz, dessen Visualisierungseffekt bereits bei Tageslicht sichtbar wird und weniger mutierende Interaktion mit den Basenkomponenten aufweist. Des Weiteren kann hierdurch eine suffiziente Auftrennung der Banden bereits während der Elektrophorese verfolgt und die Elektrophorese frühestmöglich beendet werden.

Anwendung

Die Crystal Violet Konzentration des Agarose-Gels (0,8%) liegt bei 1,2 μ g/ml. Die PCR-Reaktionslösung (50 μ l) wird mit 10 μ l eines 6 \times Crystal Violet Loading-Puffers ergänzt und in die Gelkammern aufgetragen. Als Marker kommen die *DNA molecular weight marker* VII und X von Roche zum Einsatz. Die Potentialdifferenz des Gleichspannungsfeldes liegt bei 80 V. Sobald eine suffiziente Auftrennung der amplifizierten DNA sichtbar ist, wird die Elektrophorese beendet. Die Bande von Interesse wird mit einem sterilen Skalpell ausge-

schnitten und in ein DNase, RNase freies, steriles 15 ml Reaktionsgefäß überführt.

2.8 Gelextraktion

Zur Anwendung kommt das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Es ist für die Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 70 bp bis 10 kb konstruiert. Dabei bindet die in *high-salt Puffer* gelöste DNA pH-abhängig an die Silicamembran der QIAquick spin column und kann mit low-salt Puffer eluiert werden. Während der Waschungen werden Rückstände von Primern, Nucleotiden, Enzymen, mineralischen Ölen, Agarose und Crystal Violet weitestgehend entfernt.

Anwendung

Das ausgeschnittene DNA-Fragment wird gewogen und in Puffer QG (Volumenverhältnis 1:3) gelöst. Die Lösung wird für 10 min bei 50° inkubiert und alle 2 min gevortext. Nach vollständiger Auflösung der Agarose wird ein Gelvolumen Isopropanol zugegeben. Das Gemisch wird auf eine QIAquick spin column aufgetragen und für 1 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Die Waschung erfolgt mit 0,75 ml Puffer PE. Nach der Zentrifugation wird die Säule auf ein steriles Reaktionsgefäß überführt und mit 30 µl TE-Puffer, pH 7,0 equilibriert. Zum Eluieren der DNA wird für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Konzentration und Reinheit werden photometrisch bestimmt. Längere Lagerungszeiten werden an dieser Stelle vermieden. Es folgen unmittelbar Klonierung und Transformation.

2.9 Transformation und Klonierung

Grundprinzip: Prokaryoten sind in der Lage, genetisches Material untereinander auszutauschen. Die unmittelbare Aufnahme zirkulärer DNA und Weitergabe dieser genetischen Information wird als Transformation bezeichnet. Neben Transduktion und Transfektion ist sie eine der drei Möglichkeiten des horizontalen Gentransfers. Die Transformation kompetenter Bakterien stellt in der Molekularbiologie eine wichtige Methode dar, um DNA-Fragmente nachhaltig zu vervielfältigen und stabil zu lagern. Die wichtigsten Schritte sind dabei das Herstellen kompetenter Zellen, der gemeinsame Verdau von Vektor und Insert sowie die Ligationsreaktion. Gelingt die Transformation, kann der Bakterienstamm durch Plasmid-kodierte Resistenzen selektioniert werden und in einem geeigneten Medium heranwachsen. Dabei folgt das Wachstum einer immer gleichen Kinetik, deren Kenntnis für den richtigen Moment der Plasmid-Extraktion entscheidend ist. Auf log-Phase und stationäre Phase folgt

die durch Substratverbrauch eingeleitete Absterbephase, in der frei werdende DNAsen die Integrität der Plasmide reduzieren. Dabei besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Extinktion einer LB-Bouillon und der enthaltenden Keimzahl. Die photometrische Messung erlaubt Aussagen über die augenblickliche Wachstumsphase. Die Plasmid-Extraktion sollte stets zum Zeitpunkt der logarithmischen Phase erfolgen, da hier die prokaryotische Zellwand vergleichsweise fragil ist.

2.9.1 Ligation von DNA

Grundprinzip: Plasmide sind extrachromosomale DNA-Moleküle, die sich in der prokaryotischen Zelle unabhängig vom Wirtsgenom vervielfältigen können. Konstruierte Plasmide enthalten zumeist ein Antibiotika-Resistenzgen, das zur Selektion transformierter Bakterien dient. Neben einem *origin of replication* (ori) enthalten sie eine als *multiple cloning site* bezeichnete Region, in der Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme enthalten sind. Dieses Prinzip erlaubt die Analyse und Isolation eines im Restriktionsverdau herausgeschnittenen Inserts. Um eine Insertion zu detektieren, liegt die *multiple cloning site* oft im lacZ-Gen, dessen Unterbrechung mit einer fehlenden Aktivität der β -Galaktosidase einhergeht. Insert-tragende Stämme können unter dieser Voraussetzung den farblosen Indikator X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktosid) nicht mehr verstoffwechseln, was zu einem Ausbleiben der typischen Blaufärbung betroffener Kolonien führt.

In dieser Arbeit wird der aktivierte TA-Vektor pCR-XL-TOPO verwendet. Dieser liegt als 3,5 kb langes, linearisiertes DNA-Konstrukt mit 3'-Desoxythymidin-haltigen sticky-ends vor. Das Prinzip der Klonierung folgt der Topoisomerase-Reaktion nach Shuman, 1994. Eine Topoisomerase aus dem Vaccinia Virus (Topoisomerase Typ I) ist kovalent über eine Phosphotyrosinbindung an das 3'-Phosphat-Ende des Vektors gebunden. Die durch Wasserstoffbrückenbindung begünstigte Anlagerung des PCR Produktes an die Ligationsstelle bedingt einen nucleophilen Angriff der 5'-Hydroxyl-Gruppen des Ligationsfragmentes an die Ester-gebundene Topoisomerase. Folge ist eine Abspaltung und Aktivierung des Enzymes. Eine ortsspezifische Ligation des PCR-Fragmentes an den 5'-CCCTT flankierenden Enden des Vektors wird auf diese Weise möglich (s. Abb. 5). Die Ligation eines Inserts geht mit der Zirkularisierung des Vektors einher, der von kompetenten Bakterien aufgenommen werden kann. Damit wird die X-Gal-Reaktion überflüssig. Da die Transformationseffizienz mit ca 1.000.000 Transformanden pro μ g Plasmid DNA relativ hoch ist, reichen zumeist 10 ng eines superhelikalen Plasmides aus, um eine geeignete Menge an Kolonien pro Platte zu gewinnen. Zur Anwendung kommt das pCR-XL-Topo Cloning Kit (Invitrogen, Grand Island, USA).

Anwendung

200 ng gereinigte Amplikon-DNA werden mit 10 ng pCR-XL-Topo-Vektor in einem sterilen PCR-Reaktionsgefäß gemischt. Als Negativkontrolle wird die Amplikon-DNA durch *DEPC treated water* ersetzt. Der Ansatz wird für 25 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt die Zugabe von 1 µl der 6× TOPO Cloning Stop Lösung. Der Ansatz wird kurz abzentrifugiert und auf Eis gelagert. Auf längere Lagerungszeiten wird an dieser Stelle verzichtet und unmittelbar mit der Transformation begonnen.

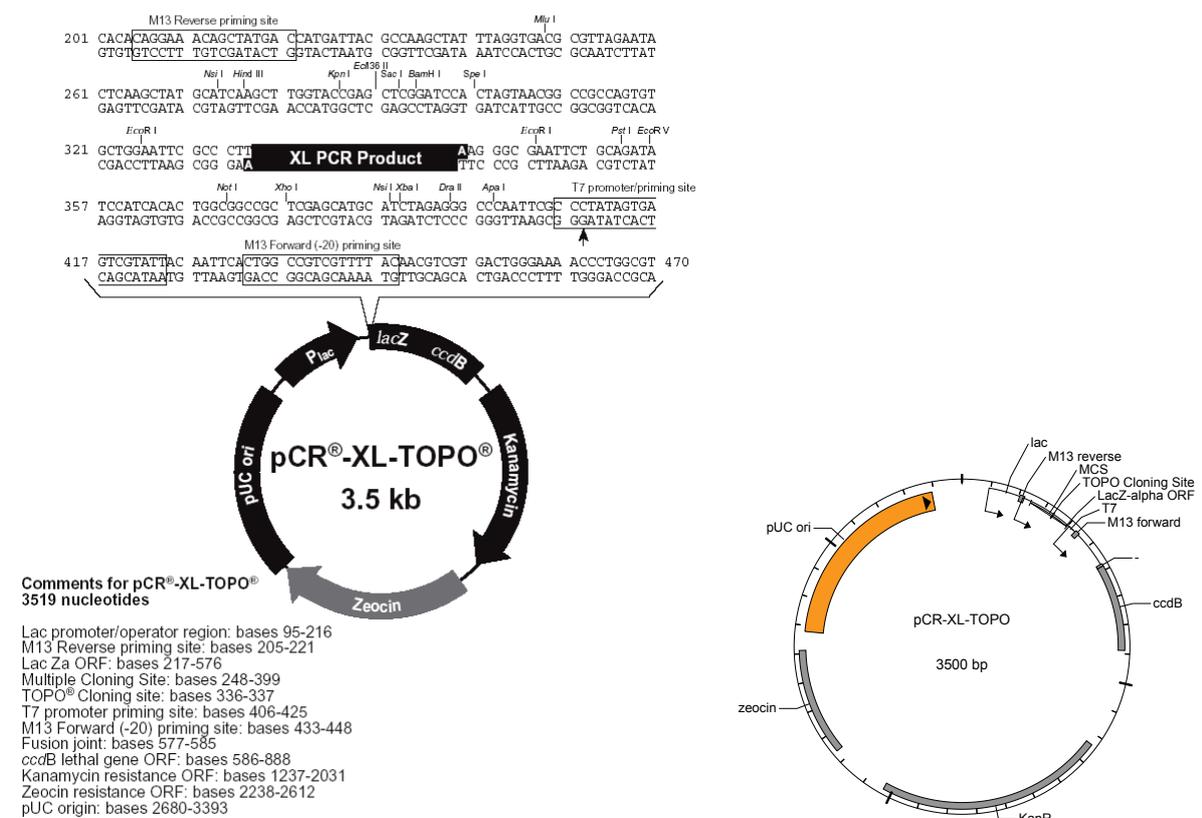


Abb. 5 Konfiguration des pCR-XL-TOPO-Vektors (Quelle: Invitrogen)

2.9.2 Transformation und Klonierung

Als Selektionszusatz wird das antibiotisch wirkende Glycosid Kanamycin A aus *Streptomyces kanamyceticus* verwendet. Nährboden und LB-Medium werden mit einer Konzentration von 50 µg/ml Kanamycin A erstellt (s. 2.1).

Anwendung

3 µl des Transformations-Ansatzes (s. oben) werden in 50 µl *E. coli* Suspension überführt, vorsichtig geschwenkt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation erfolgen für 40 Sek. ein Hitzeschock bei 42° C und unmittelbar darauf die Abkühlung auf Eis. Zu den Ansätzen werden jeweils 250 µl S.O.C. medium (25° C) pipettiert und 1 h bei 37° C horizontal geschüttelt. Unter sterilen Bedingungen werden 125 µl des Transformationsansatzes auf eine vorgewärmte (37° C) LB-Agarplatte pipettiert und ausgestrichen. Die Platten werden bei 37° C für 24 h inkubiert. Mit einer Pipettenspitze wird eine Kolonie pro Platte in 250 ml LB Medium (50 µg/ml Kanamycin A) überführt und bei 37° C geschüttelt. Nach Erreichen einer OD(600)=1 erfolgt die Extraktion des Plasmids.

2.10 Plasmid Extraktion

Ziel ist die selektive Isolierung von Plasmid-DNA aus LB-Kulturen. Nach alkalischer Lyse und Ausfällung eines abzentrifugierten Bakterienpellets folgt in einem weiteren Zentrifugationsschritt die pH-abhängige Bindung von spiralförmiger Plasmid-DNA an ein Anionenaustauschharz (Nukleobond) unter *low-salt Bedingungen*. Bakterienbestandteile werden in zwei Waschschritten entfernt. Mit einem *high-salt Puffer* wird die Plasmid-DNA aus dem Harz eluiert und durch Fällung mit Isopropanol entsalzt. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wird in TE Puffer gelöst. Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA werden photometrisch bestimmt. Zur Anwendung kommt das Plasmid Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Anwendung

50 ml einer LB-Kultur werden in autoklavierten 50 ml Oak Ridge Centrifuge Tubes 15 min bei 4° C und 6000×g zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml Puffer P1 resuspendiert, mit 10 ml Puffer P2 gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ausfällung erfolgt durch Zugabe von 10 ml Puffer P3 und 20-minütiger Inkubation auf Eis. Das Präzipitat wird für 30 min bei 4° C und 20.000×g zentrifugiert. Der Plasmid-enthaltende Überstand wird ein weiteres Mal für 15 Minuten bei 4° C und 20000×g zentrifugiert und der Überstand über ein BD Falcon Cell Strainer auf das mit Puffer QBT equilibrierte Qiagen Tip überführt. Die Waschung des Harzes erfolgt durch Zugabe von 2 × 30 ml Buffer QC. Die an das Anionenaustauschharz gebundene Plasmid-DNA wird mit 15 ml high-salt Puffer QF eluiert. Das Eluat wird in einem sterilen 15 ml Falcontube aufgefangen. Die Fällung der

2 Patienten, Material und Methoden

DNA erfolgt durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol (Verhältnis 0,7). Die Suspension wird für 30 Minuten bei 4° C und 15.000×g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig verworfen. Das DNA-Pellet wird mit 5 ml Ethanol (70%) gewaschen und für 10 Minuten bei 15.000×g zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig verworfen, das gewaschene DNA Pellet ca. 10 min luftgetrocknet und in 300 µl TE Puffer (pH 8,0) gelöst. Die Reinheit und Konzentration der Plasmid DNA wird photometrisch bestimmt.

2.11 Restriktionsverdau

Das Ziel des Restriktionsverdaus ist die Identifizierung des Vektors und eine Isolation der Inserts *CYP11B2* und *CYP11B1/B2*. Der Startpunkt der Inserts liegt an Position 336 des Vektors. An Position 326 und 344 liegt die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym EcoRI. Die aus *E. coli* isolierte Nuklease schneidet das PCR-Produkt mit unwesentlichem Vektoranteil aus dem Plasmid. Um den Vektor zu fragmentieren, wird das Restriktionsenzym SapI verwendet. Dabei entstehen insgesamt vier Fragmente (Fragment A: ca. 1600 bp • Fragment B: ca. 1450 bp • Fragment C: ca. 300 bp • Fragment D: ca. 200 bp).

Restriktionsenzym	Anzahl der Schnittstellen	Position der Schnittstelle
EcoRI	2	326, 344
SapI	3	1710, 1920, 3512

Anwendung:

Die Ansätze werden wie folgt pipettiert:

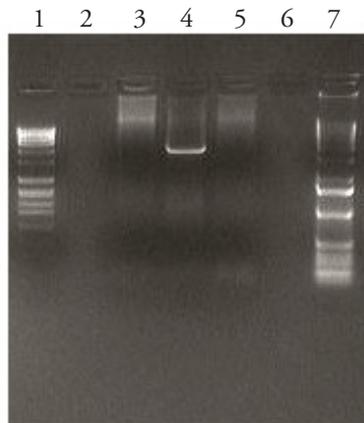
Plasmid	500 ng
EcoRI	1 µl
SapI	1 µl
10X NE4 Puffer	5 µl
100X BSA	0.5 µl
PCR grade water	ad 50 µl

Der Ansatz wird 40–60 Minuten bei 37° C inkubiert. Im Anschluss erfolgt eine 20 minütige Inaktivierung der Enzyme bei 80° C. Durch eine Gelelektrophorese wird das Ergebnis der Restriktion visualisiert. Die DNA des separierten Inserts wird extrahiert und aufgereinigt.

2.12 Plasmid Sequenzierung

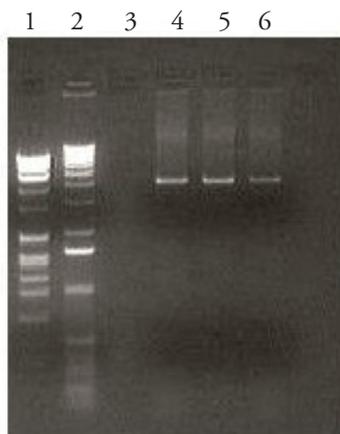
Die aufgereinigten Inserts werden durch die Didesoxymethode nach Sanger sequenziert. Ausgehend von einer bekannten Sequenz, in diesem Falle der Sequenzen der Primer 1-3, werden vier Ansätze mit je einem Teil radioaktiv markiertem Didesoxynucleotid-triphosphat (ddNTP) und den verbleibenden Desoxynucleotid-triphosphaten (dNTP) erstellt und eine enzymatische DNA-Polymerisierung gestartet. Sobald der Komplementärstrang den Einbau des ddNTPs erfordert, bricht die Polymerisierung ab. Es entstehen Fragmente unterschiedlichster Länge, die in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese ausgewertet werden. Das endständige Nucleotid entspricht dabei dem beigefügten ddNTP. Auf diese Weise kann an Hand des in einer Fotokammer ausgewerteten Bandenmusters die Basensequenz der Template-DNA ausgewertet werden. Die Sequenzierung wird aus logistischen Gründen von den Kollegen des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums der Heinrich Heine Universität Düsseldorf (BMFZ) durchgeführt. Die graphische Auswertung (s. Ergebnisse) erfolgt mit Hilfe der Software *CLC Sequence Viewer*.

3.1 Auswertung der PCR



- | | |
|--------------|--------------|
| 1 Marker VII | 5 Primer 1/3 |
| 2 Leer-PCR | 6 Leer-PCR |
| 3 Primer 1/3 | 7 Marker X |
| 4 Primer 2/3 | |

Abb. 6 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Fragmente eines gesunden Probanden. In der Abbildung ist das Ergebnis der PCR mit genomischer DNA eines gesunden Probanden dargestellt. Es werden drei PCR Ansätze mit identischer Template DNA aufgetragen. In Spur 4 ist bei ca. 4 kb das *CYP11B2* Amplikon zu erkennen. Die Primerkombination für das Hybridgen (Spuren 3+5) führt hier nicht zur Amplifikation eines entsprechenden Fragmentes. Die Visualisierung erfolgt mit Ethidium-Bromid.



- | | |
|--------------|--------------|
| 1 Marker VII | 4 Primer 1/3 |
| 2 Marker X | 5 Primer 2/3 |
| 3 Leer-PCR | 6 Primer 1/3 |

Abb. 7 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Fragmente eines Patienten mit familiärem Hyperaldosteronismus Typ 1. In der Abbildung ist das Ergebnis der PCR mit genomischer DNA eines Patienten mit familiärem Hyperaldosteronismus Typ 1 dargestellt. Erkennbar ist die Amplifikation von *CYP11B2* (5) und *CYP11B1/CYP11B2* (4 + 6) als Banden bei ca. 4 kb. Die Visualisierung erfolgt mit Ethidium-Bromid.

3.2 Klonierung

Im Mittel wachsen ca. 120 Kolonien pro Platte. Dabei hat sich ein 20-facher Überschuss an PCR-DNA gegenüber Vektor-DNA pro Ligationsansatz (200 ng PCR-DNA, 10 ng Vektor DNA) als günstig herausgestellt. Nach Erreichen einer optischen Dichte von $OD(600)=1$ ($OD600 = 1 \approx 1 \times 10^9$ Zellen/ml) wird die LB-Kultur der Plasmid Extraktion zugeführt. Die photometrisch bestimmte Plasmid-DNA Konzentration des sequenzierten Plasmid-Ansatzes pcr-XL-TOPO-CYP11B2 (siehe 3.4) liegt bei 1076 ng/ μ l, die Konzentration des Plasmid Ansatzes pcr-XL-TOPO-CYP11B1/B2 liegt bei 410 ng/ μ l doppelsträngiger DNA.

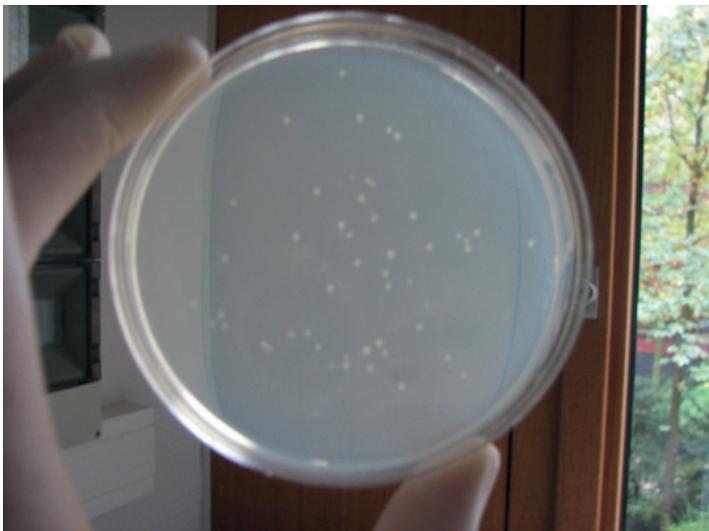


Abb. 8a. Transformation
mit pCR-XL-TOPO-CYP11B1/B2

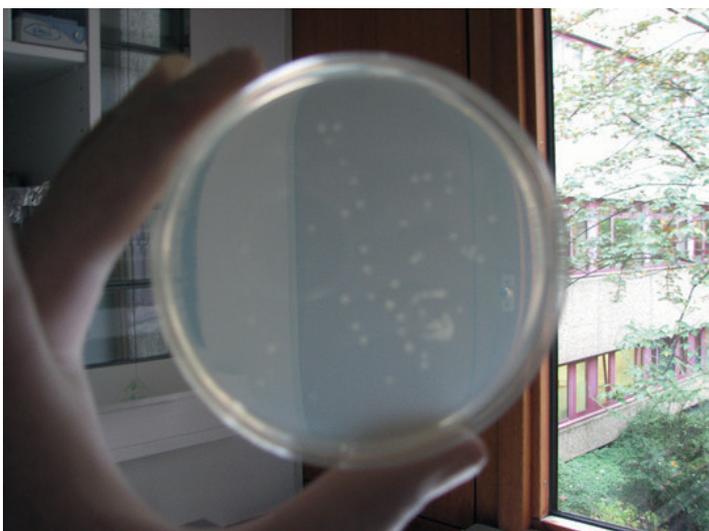
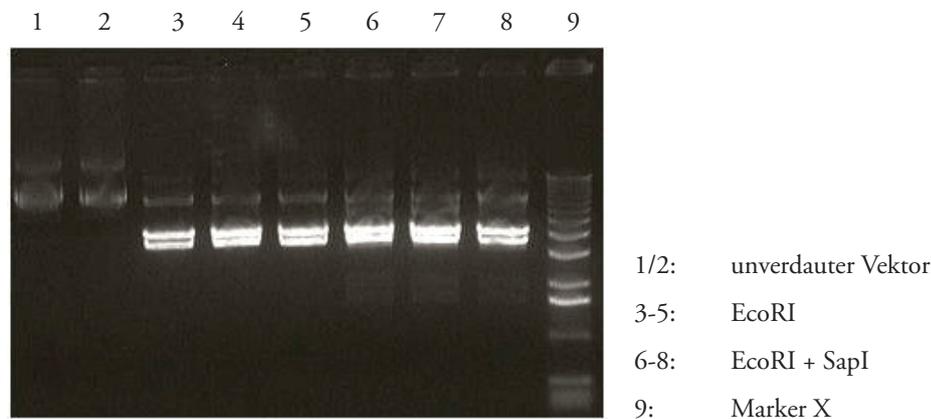


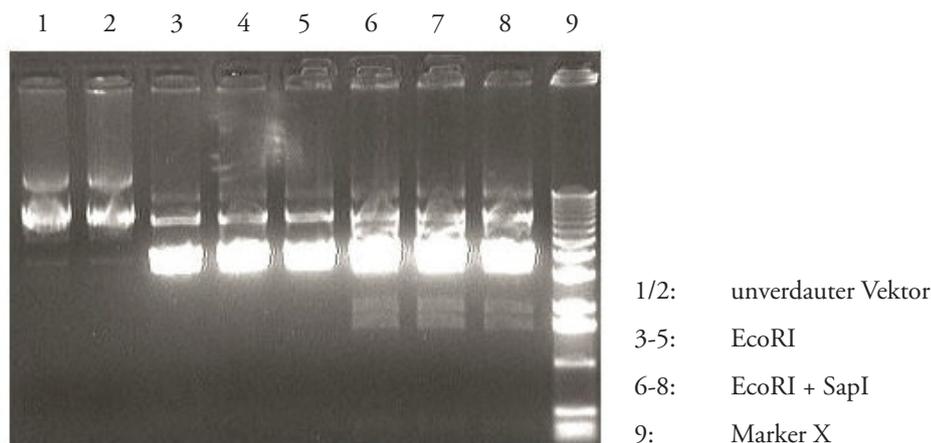
Abb. 8b. Transformation
mit pCR-XL-TOPO-CYP11B2

3.3 Restriktionsverdau

3.3.1 Restriktion von pCR-XL-TOPO-CYP11B2



UV exposure time: 0,12 s



UV exposure time: 0,94 s

Abb. 9 Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaues von pCR-XL-TOPO-CYP11B2. In den Spuren 1 und 2 wird als Negativkontrolle unverdauter Vektor aufgetragen. Sichtbar sind zwei Banden bei 7500 bp und 13000 bp. Die Spreizung der Banden ist auf verschiedene Zustandsformen des Vektors pCR-XL-TOPO-CYP11B2 (supercoiled Strukturen) zurückzuführen, durch die das Molekülnetz der Agarose keinen konstanten Widerstand darstellt. In den Spuren 3-5 wurde mit EcoRI verdaut. Zu erkennen sind zwei Banden bei 4000 bp (PCR-Insert) bzw. 3500 bp (pCR-XL-TOPO) sowie eine gespreizte Bande zwischen 7500 bp und 12.000 bp (pCR-XL-TOPO-CYP11B2). In den Spuren 6-8 ist das Ergebnis des *double digest* mit EcoRI und SapI zu sehen. Sichtbar sind zwei Banden bei 4000 bp (PCR-Insert) und 3500 bp (pCR-XL-TOPO), eine gespreizte Bande zwischen 7500 bp und 12.000 bp (pCR-XL-TOPO-CYP11B2) sowie die Fragmentierung von pCR-XL-TOPO zwischen 1500 bp und 1800 bp, sowie schwach bei ca. 200 bp. Der Restriktionsverdau dauert 40 Minuten bei 37° C und wird mit Ethidium-Bromid visualisiert.

3.3.2 Restriktion von pCR-XL-TOPO-CYP11B1/B2

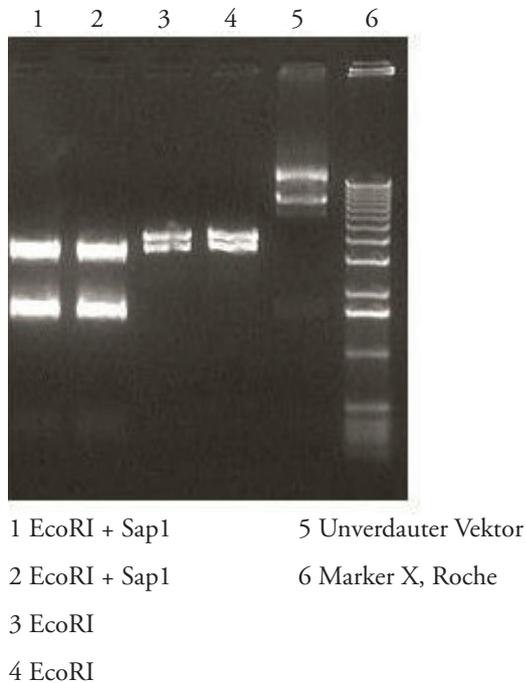


Abb. 10 Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus von pCR-XL-TOPO-CYP11B1/B2. In den Spuren 1 und 2 wird der Verdau mit EcoRI und SapI aufgetragen. Zu erkennen sind Banden bei 4000 bp (PCR-Insert), 3500 bp (Topo-Vektor), 1600 bp (Fragment 1+2) und schwach sichtbar bei ca. 200 bp (Fragment 3+4). Bedingt durch das Auflösungsvermögen der Elektrophorese sind die Fragmente 1 und 2 sowie 3 und 4 untereinander schwer abzugrenzen. In den Spuren 3 und 4 wird der Verdau mit EcoRI sichtbar. Abzugrenzen sind zwei Fragmente bei 4000 bp (PCR-Insert) und 3500 bp (Vektor). In Spur 5 ist als Negativkontrolle unverdauter Vektor aufgetragen. Sichtbar sind eine Bande bei 7500 bp und 13000 bp. Die Spreizung des Bereiches ist auf verschiedene Zustandsformen des Vektors (supercoiled Strukturen) zurückzuführen. Die Visualisierung erfolgt mit Ethidium-Bromid.

3.4 Sequenzierung

3.4.1 Sequenzierung des klonierten *CYP11B2*-Inserts

Aus dem extrahierten Plasmid pcr-XL-TOPO-*CYP11B2* wird das *CYP11B2*-Insert im Restriktionsverdau herausgeschnitten und durch Gelelektrophorese und Gelextraktion isoliert. Die photometrische Bestimmung der Konzentration des für die Sequenzierung verwendeten Ansatzes ergibt einen Gehalt von 37 ng/µl doppelsträngiger DNA nach Gelextraktion. Das isolierte Fragment wird einer Sequenzierung zugeführt, um Insert- und Wildtyp-Sequenz zu vergleichen. Sequenziert werden 572 Basen abwärts der bekannten Sequenz von Primer 2 sowie 560 Basen aufwärts von Primer 3. Die Insert-Sequenz wird mit den Sequenzen der Zielgene verglichen. Hier zeigt sich ausgehend von Primer 2 eine Übereinstimmung von 100 % (572/572) mit dem *CYP11B2*-Abschnitt 4887-5458 (Abb. 11/12). Die Sequenz ab Primer 3 stimmt zu 99 % (554/560, 5 Einzelmutationen, 1 Gap) mit dem *CYP11B2*-Abschnitt 8315-8873 überein (Abb. 11/13). Beide Abschnitte liegen in dem amplifizierten Bereich von *CYP11B2*. Die Ergebnisse der Sequenzierung schließen auf eine erfolgreiche Amplifizierung und Insertion. Damit kann das Plasmid pCR-XL-TOPO-*CYP11B2* in weiteren Arbeitsschritten als Transformationsvektor und als Template der PCR verwendet werden. Es lässt sich beliebig oft vervielfältigen und sichert den Grundstock einer Testkontrolle für die diagnostische PCR. Die vollständigen Sequenzen befinden sich in Tabelle 2 im Anhang.

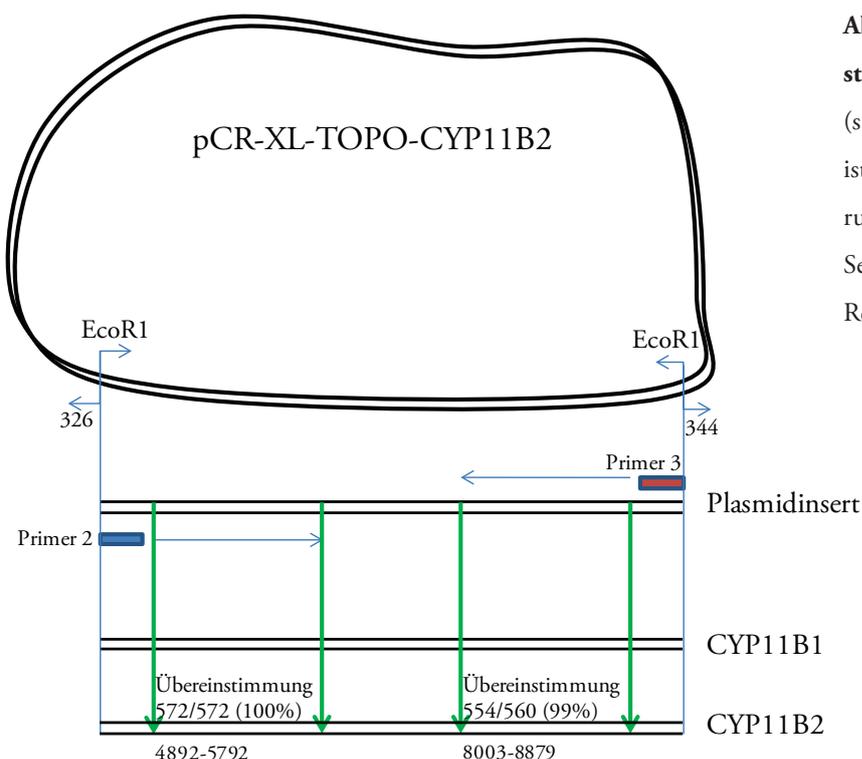


Abb. 11 Schematische Darstellung der Sequenzanalyse (s. auch Abb. 12/13) Dargestellt ist eine schematische Überlagerung des Plasmidinserts mit der Sequenz von *CYP11B2* nach Restriktion mit EcoR1.

3.4.2 Sequenzierung des klonierten Hybridgens

Sequenziert werden 903 Basen ab der Sequenz von Primer 1 und 877 Basen ab Primer 3. Davon stimmen 902 von 903 Basen mit dem Abschnitt 4892-5792 von *CYP11B1* (99,9%, 1 Einzelmutation) (Abb. 14/15) und 865 von 877 (99%, 7 Einzelmutationen, 5 undefinierte Basen) mit dem Abschnitt 8003-8879 von *CYP11B2* überein (Abb. 14/16). Das Ergebnis beweist die erfolgreiche Amplifikation und Insertion des ausgewählten Hybridgenbereiches und sichert die Spezifität der ausgewählten Primer. Das Plasmid pCR-XL-TOPO-*CYP11B1/B2* kann in folgenden Arbeitsschritten beliebig oft vervielfältigt werden. Es sichert den Grundstock einer weiteren Testkontrolle für die diagnostische PCR. Die ausreichende Menge an Probenmaterial erlaubt detaillierte Untersuchungen des Gendefektes. Beispielsweise kann durch eine Sequenzierung mit Bruchpunkt-nahen Primern das individuelle Cross-over dargestellt werden (s. unten).

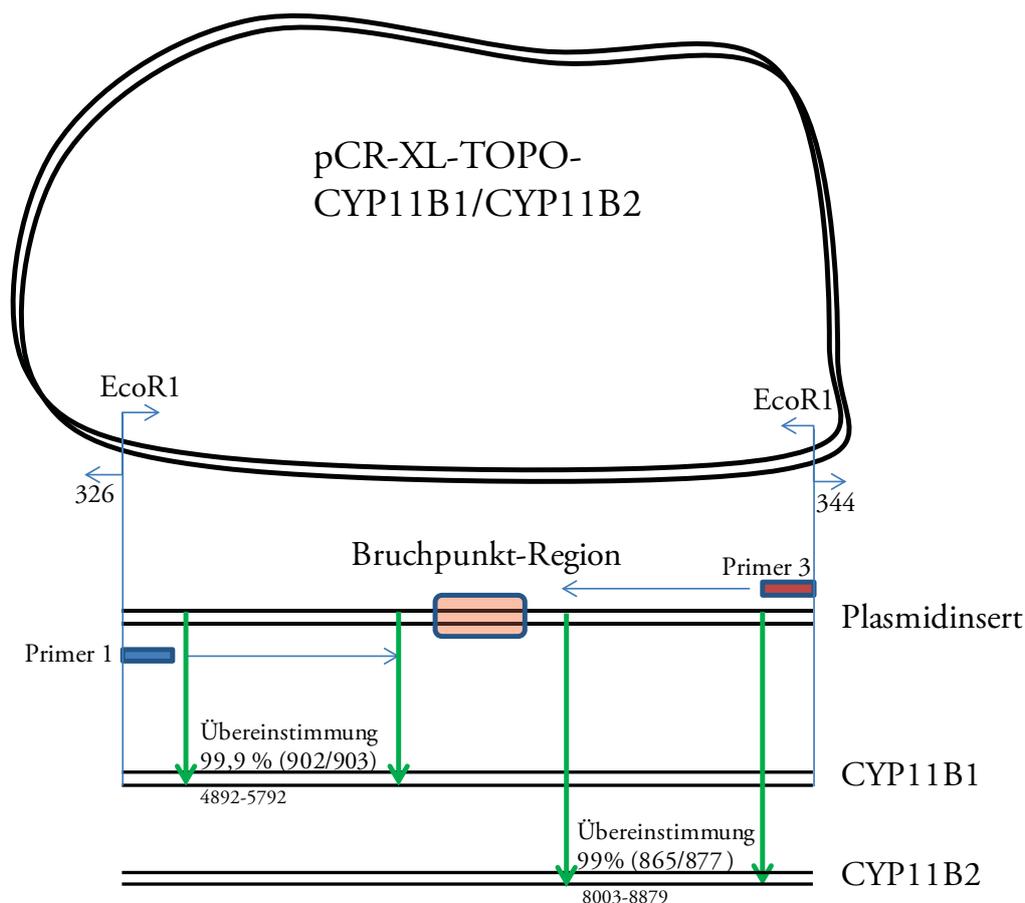


Abb. 14 Schematische Darstellung der Sequenzanalyse (s. auch Abb. 15/16) Dargestellt ist eine schematische Überlagerung des Plasmidinserts mit der Sequenz von *CYP11B1* und *CYP11B2* nach Restriktion mit EcoRI. Rot eingefärbt ist die Bruchpunkt-Region, die in der Bruchpunktanalyse näher beschrieben wird (s. Kapitel 3.5).

3 Ergebnisse

```
Query 2 CCTCGGTCTCTCAGGCAGATCCAGGGCCAGTTCTCCCATGACGTGATCCCTCTCGAAGGC 61
      |||
Sbjct 4892 CCTCGGTCTCTCAGGCAGATCCAGGGCCAGTTCTCCCATGACGTGATCCCTCTCGAAGGC 4951

Query 62 AAGGCACCAGGCAAGATAAAAGGATTGCAGCTGAACAGGGCGGAGGGAGCATTGGAATGG 121
      |||
Sbjct 4952 AAGGCACCAGGCAAGATAAAAGGATTGCAGCTGAACAGGGTGGAGGGAGCATTGGAATGG 5011

Query 122 CACTCAGGGCAAAGGCAGAGGTGTGCATGGCAGTGCCTGGCTGTCCCTGCAAAGGGCAC 181
      |||
Sbjct 5012 CACTCAGGGCAAAGGCAGAGGTGTGCATGGCAGTGCCTGGCTGTCCCTGCAAAGGGCAC 5071

Query 182 AGGCACTGGGCACGAGAGCCGCCGGTCCCAGGACAGTGTGCCCTTTGAAGCCATGC 241
      |||
Sbjct 5072 AGGCACTGGGCACGAGAGCCGCCGGTCCCAGGACAGTGTGCCCTTTGAAGCCATGC 5131

Query 242 CCCGGCGTCCAGGCAACAGGTGGCTGAGGCTGCTGCAGATCTGGAGGGAGCAGGGTTATG 301
      |||
Sbjct 5132 CCCGGCGTCCAGGCAACAGGTGGCTGAGGCTGCTGCAGATCTGGAGGGAGCAGGGTTATG 5191

Query 302 AGGACCTGCACCTGGAAGTACACCAGACCTTCCAGGAACTAGGGCCCATTTTCAGGTAAA 361
      |||
Sbjct 5192 AGGACCTGCACCTGGAAGTACACCAGACCTTCCAGGAACTAGGGCCCATTTTCAGGTAAA 5251

Query 362 GCCCTCCCTGGCCCTCGCTGGGAACACCCAGAGCCCTGCCCTTGCTGCCAGGACCCTGC 421
      |||
Sbjct 5252 GCCCTCCCTGGCCCTCGCTGGGAACACCCAGAGCCCTGCCCTTGCTGCCAGGACCCTGC 5311

Query 422 CGGGCACTCAGCACTGCCATTCCCAGCAGGTCCCAGCACTCTGCATCCTTTGGAAGATGG 481
      |||
Sbjct 5312 CGGGCACTCAGCACTGCCATTCCCAGCAGGTCCCAGCACTCTGCATCCTTTGGAAGATGG 5371

Query 482 GGAAGGAGTGCAGCACGTGTGGTCTGTGGCGCTGCCAGGGCAGGGGATGGTGCAGAGCA 541
      |||
Sbjct 5372 GGAAGGAGTGCAGCACGTGTGGTCTGTGGCGCTGCCAGGGCAGGGGATGGTGCAGAGCA 5431

Query 542 AATCCCAGCTCGCTGCAGAGAGGGCAGGACTCAGAGGCACCTGAAGTTAAGAGGTTCCGGG 601
      |||
Sbjct 5432 AATCCCAGCTCGCTGCAGAGAGGGCAGGACTCAGAGGCACCTGAAGTTAAGAGGTTCCGGG 5491

Query 602 CAGTCAGCAAGAGGGCTTTAGCTGTGAAGCCGCTAATCCAGGAGAGGGGAGGGTGGACAG 661
      |||
Sbjct 5492 CAGTCAGCAAGAGGGCTTTAGCTGTGAAGCCGCTAATCCAGGAGAGGGGAGGGTGGACAG 5551

Query 662 GAGACACTTTGGATTGGGACTGCAGGGTGGGGCTAGCGGGGACATGGTCCCATCCAGCAC 721
      |||
Sbjct 5552 GAGACACTTTGGATTGGGACTGCAGGGTGGGGCTAGCGGGGACATGGTCCCATCCAGCAC 5611

Query 722 GGCCTCGTGCTTGGCCCCACAGGTACGACTTGGGAGGAGCAGGCATGGTGTGTGTGATGC 781
      |||
Sbjct 5612 GGCCTCGTGCTTGGCCCCACAGGTACGACTTGGGAGGAGCAGGCATGGTGTGTGTGATGC 5671

Query 782 TGCCGGAGGACGTGGAGAAGCTGCAACAGGTGGACAGCCTGCATCCCCACAGGATGAGCC 841
      |||
Sbjct 5672 TGCCGGAGGACGTGGAGAAGCTGCAACAGGTGGACAGCCTGCATCCCCACAGGATGAGCC 5731

Query 842 TGGAGCCCTGGGTGGCCTACAGACAACATCGTGGGCACAAATGTGGCGTGTCTTGCTGT 901
      |||
Sbjct 5732 TGGAGCCCTGGGTGGCCTACAGACAACATCGTGGGCACAAATGTGGCGTGTCTTGCTGT 5791

Query 902 AAG 904
      |||
Sbjct 5792 AAG 5794
```

Abb. 15 Sequenzvergleich des Inserts ab Primer 1 (Query) mit *CYP11B1* (Sbjct). Auszug aus der Analyse: Score = 1663 bits (900), Expect = 0.0 Identities = 902/903 (99%), Gaps = 0/903 (0%) Strand=Plus/Plus. Software: Nucleotide Blast, pubmed.com

3 Ergebnisse

Query	1	CTTTCAGTGGGGACAGAGCTGCTGTGTGTCCAGGGCCTCATCCAACCTTTCTCCNNCCT	60
Sbjct	8879	CTTTCAGTGGGGACAGAGCTGCTGTGTGTCCAGGGCCTCATCCAACCTTTCTCCAGCCT	8820
Query	61	GGAGCATGGATCCCCACACAGGTAAGTCAAACTCAGTCTCATGTGAGGGGGAGCTCACA	120
Sbjct	8819	GGAGCATGGATCCCCACACAGGTAAGTCAAACTCAGTCTCATGTGAGGGGGAGCTCACA	8760
Query	121	TTTCCCCTCCCCTGCAAATCTCATCCCTTAACAAAGGAGAGGGGAAGGCTGAGGGCAACAG	180
Sbjct	8759	TTTCCCCTCCCCTGCAAATCTCATCCCTTAACAAAGGAGGGGAAGGCTGAGGGCAACAG	8700
Query	181	AAATGTGGGGCCTGTAGCCTGGGGATGGGGAACGNGGGTGCCGTGTGGCATTGGCAGGCA	240
Sbjct	8699	AAATGTGGGGCCTGTAGCCTGGGGATGGGGAACGNGGGTGCCGTGTGGCATTGGCAGGCA	8640
Query	241	GTGCCTGGGAGGCAGGCTTGGCATCNCCTCTCTGGGTGGGGCTGGTTGCTGGCCTGACC	300
Sbjct	8639	GTGCCTGGGAGGCAGGCTTGGCATCACCCTCTCTGGGTGGGGCTGGTTGCTGGCCTGACC	8580
Query	301	GTGTCCACGCTCCCTGCAGTGAGTTCATAGAGTTGGCCTTGATGGCTTCTAGTGACAGT	360
Sbjct	8579	GTGTCCACGCTCCCTGCAGTGAGTTCATAGAGTTGGCCTTGATGGCTTCTAGTGACAGT	8520
Query	361	TCCGCCTTCAACAGGAGCTCTGCCACGATGCCTGTGTAGTGTGAGGGCGGTTGAAGGCC	420
Sbjct	8519	TCCGCCTTCAACAGGAGCTCCGCCACGATGCCTGTGTAGTGTGAGGGCGGTTGAAGGCC	8460
Query	421	AGTTCCTGGTAGATTTTCTGGATACAGTTGTCACCTGTCCAGGGAGCAGGGGACAGCCCT	480
Sbjct	8459	AGTTCCTGGTAGATTTTCTGGATACAGTTGTCACCTGTCCAGGGAGCAGGGGACAGCCCT	8400
Query	481	CAGATCTTGGTGCTGGGAAACATCCTTCAGTGTCTCCTCCTGCCAGACTGCCCCGACA	540
Sbjct	8399	CAGATCTTGGTGCTGGGAAACATCCTTCAGTGTCTCCTCCTGCCAGACTGCCCCGACA	8340
Query	541	CCCAAATCTCCCTGCTCTCATCCCAAATTCCTCCGATCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCTC	600
Sbjct	8339	CCCAAATCTCCCTGCTCTCATCCCAAATTCCTCCGATCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCTC	8280
Query	601	GCACCAATCTCCCTGGCAGGAAGGCGAGGAATCCCCGACCCCTCCCTGTGGCCTCCATTC	660
Sbjct	8279	GCACCAATCTCCCGCAGGAAGGTGAGGAATCCCCGACCCCTCCCTGTGGCCTCCATTC	8220
Query	661	CCCACTGGGTGGTGGAGAGGAGAAATTGGGCCCCCATGGTGTCCCTTCCCATAGCACT	720
Sbjct	8219	CCCACTGGGTGGTGGAGAAGGAGAAATTGGGCCCCCATGGTGTCCCTTCCCATAGCACT	8160
Query	721	GCCCGGGTCCCTGGCCTCACCGTACTGGAAGATGCAGTCCCAGGCCTCAAAGTGCTCCTT	780
Sbjct	8159	GCCCGGGTCCCTGGCCTCACCGTACTGGAAGATGCAGTCCCAGGCCTCAAAGTGCTCCTT	8100
Query	781	CCACACCTCGGGCTGATCCAGCGAGACAGGCTCCTGGGCATGAACATGAGCTGGACGGT	840
Sbjct	8099	CCACACCTTGGGGCTGATCCAGCGAGACAGGCTCCTGGGCATGAACATGAGCTGGACGGT	8040
Query	841	GGATTTGAACATGACCTCCAGGGCATGGANGAAGTTC	877
Sbjct	8039	GGATTTGAACATGACCTCCAGGGCATGGAGGAAGTTC	8003

Abb. 16 Sequenzvergleich des Inserts ab Primer 3 (Query) mit CYP11B2 (Sbjct). Auszug aus der Analyse: Score = 1563 bits (846), Expect = 0.0 Identities = 865/877 (99%), Gaps = 0/877 (0%). Software: Nucleotide Blast, pubmed.com

3.5 Bruchpunktanalyse

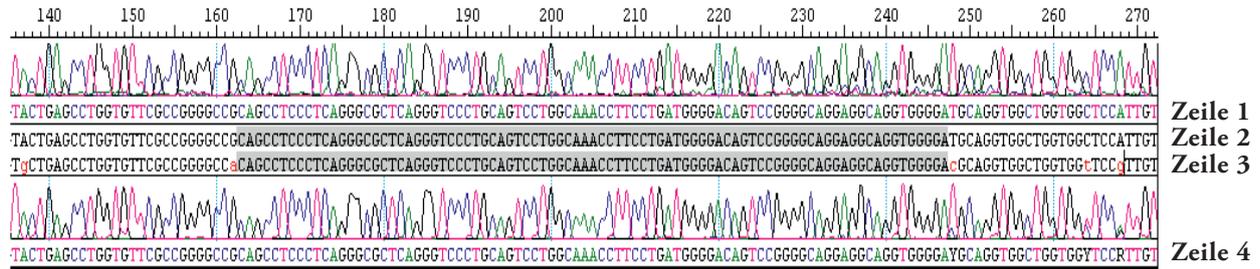


Abb. 17 Bruchpunktanalyse des in dieser Arbeit klonierten Hybridgens (aus Vonend et al. Nephrol Dial Transplant 2007). Die Sequenz der nicht betroffenen Person (Zeile 1) ist eindeutig der Wildtyp-Sequenz von *CYP11B1* (Zeile 2) zuzuordnen. Die betroffene Person (Zeile 4) zeigt abwärts des grau eingefärbten Bruchpunktes eine Überlagerung von *CYP11B1* und *CYP11B2* im Sinne einer Heterozygotie aus der Wildtypvariante von *CYP11B1* und dem *CYP11B2* Anteil des Chimärs *CYP11B1/B2*. Zeile 1: *CYP11B1*-Sequenz einer nicht betroffenen Person, Zeile 2: Wildtyp-Sequenz von *CYP11B1*, Zeile 3: Wildtyp-Sequenz von *CYP11B2*, Zeile 4: Sequenz des in dieser Arbeit verwendeten Chimärs.

3.6 Diagnostisches Assay

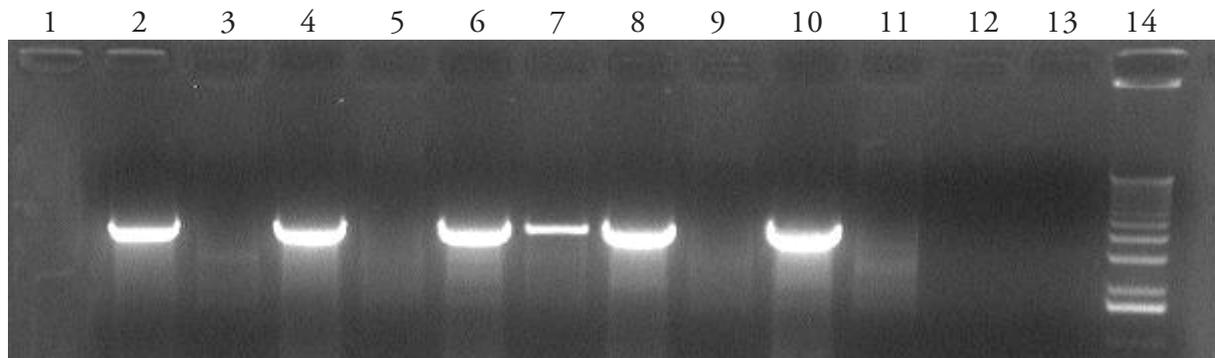


Abb. 18 Agarose-Gelelektrophorese eines diagnostischen PCR-Assays. Der Test detektiert das Hybridgen bei Patient 2 (Spuren 7+8). Damit liegt definitionsgemäß ein Familiärer Hyperaldosteronismus Typ 1 vor. In diesem Fall handelt es sich um eine der blinden Positivkontrollen. Die Patienten 1 (Spuren 5+6) und 3 (Spuren 9+10) weisen keine Hybridgen-Konstellation auf. Die Visualisierung erfolgt mit Ethidium-Bromid. Folgende Templates werden verwendet: 1 *CYP11B2*-Insert (Primer 1+3, Negativkontrolle), 2 *CYP11B2*-Insert (Primer 2+3, Positivkontrolle), 3 *CYP11B1/B2*-Insert (Primer 2+3, Negativkontrolle), 4 *CYP11B1/B2*-Insert (Primer 1+3, Positivkontrolle), 5 Patient 1 (Primer 1+3), 6 Patient 1 (Primer 2+3), 7 Patient 2 (Primer 1+3), 8 Patient 2 (Primer 2+3), 9 Patient 3 (Primer 1+3), 10 Patient 3 (Primer 2+3), 11 Leer-PCR (Primer 2+3), 12 Leer-PCR (Primer 1+3), 14 Marker X, Roche

3.7 Statistische Auswertung der Patientendaten

Die Auswertung der klinischen und laboranalytischen Parameter ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Eine graphische Darstellung der Parameter systolischer Blutdruck, diastolischer Blutdruck und Aldosteron/Renin-Quotient (ARQ) ist in den Abbildungen 19-21 als Boxplot-Diagramm dargestellt. Dabei wird die Gruppe „Primärer Hyperaldosteronismus“ mit PA, die Gruppe „essenzielle Hypertonie“ mit HTN abgekürzt. Statistisch ausgewertet wird ausschließlich das Patientenkollektiv der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Die bereits positiv getesteten Patienten, die als „blinde Kontrollen“ mitgetestet wurden (s. Seite 13), werden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Entsprechende Angaben finden sich in den jeweiligen Publikationen (Vonend et al. Nephrol Dial Transplant 2007, Kamrath et al. Horm Res Paediatr 2011).

Die Anzahl der Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus (n=33) liegt über der Anzahl der Patienten mit essenzieller Hypertonie (n=26). Die PA-Patienten sind im Mittel älter (58,3 Jahre) als die HTN-Patienten (53,3 Jahre). Dabei liegt der mittlere Blutdruck in der PA-Kohorte (149,6 / 89,4 mmHg) leicht über dem mittleren Blutdruck der HTN-Kohorte (146,8 / 89,5 mmHg). Die mittleren Aldosteron-Spiegel und der mittlere Aldosteron-Renin-Quotient in der PA-Kohorte sind signifikant höher als in der HTN-Kohorte (P<0,0001). Insgesamt zeigt das diagnostische Assay zwei Positivbefunde an, die den blind eingeschleusten FHA-Patienten entsprechen (s. auch Abb. 18). Bei allen weiteren Proben wird kein Hybridgen nachgewiesen (s. Diskussion).

	PA	HTN	P-Wert	Testart
Anzahl	33	26		
Alter (a)	58,3 ± 10,8	53,3 ± 14,7	0,1388	t-Test
Geschlecht (m/w)	15/18	9/17		Chi ² -Test
Körpergröße (cm)	174,5 ± 11,1	166,2 ± 18,3	0,1406	Mann-Whitney-Test
Körpergewicht (kg)	87,2 ± 20,8	78,9 ± 15,2	0,1968	t-Test
BMI (kg/m²)	28,4 ± 5,6	27,2 ± 4	0,4237	t-Test
systolischer RR (mmHg)	149,6 ± 19,2	146,8 ± 27,6	0,6571	t-Test
diastolischer RR (mmHg)	89,4 ± 11	89,5 ± 13,9	0,9651	t-Test
Aldosteron (ng/L)	239,2 ± 185,6	89,7 ± 83,9	P<0,0001	M.-W.-Test
Renin (ng/L)	2,7 ± 2,8	10,9 ± 22,4	0,0317	M.-W.-Test
Aldosteron-Renin-Quotient	147,8 ± 154,5	23,3 ± 26,6	P<0,0001	Mann-Whitney-Test

Tab. 1 Vergleich der klinischen und laboranalytischen Parameter der PA- und HTN-Patienten (dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung), die auf das Vorliegen des Hybridgens getestet wurden. Abkürzungen: PA: Kohorte primärer Hyperaldosteronismus, HTN: Kohorte arterielle Hypertonie, BMI: Body-Mass-Index, RR: Blutdruck, m: männlich, w: weiblich

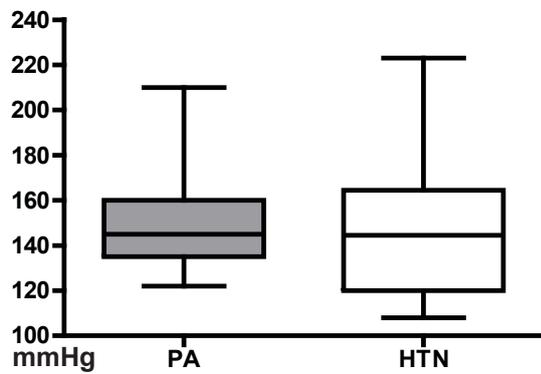


Abb. 19 Vergleich der systolischen Blutdrücke der PA- und HTN-Patienten, dargestellt als Boxplot-Diagramm.

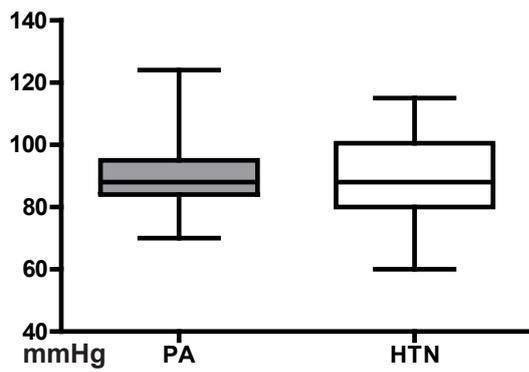


Abb. 20 Vergleich der diastolischen Blutdrücke der PA- und HTN-Patienten, dargestellt als Boxplot-Diagramm.

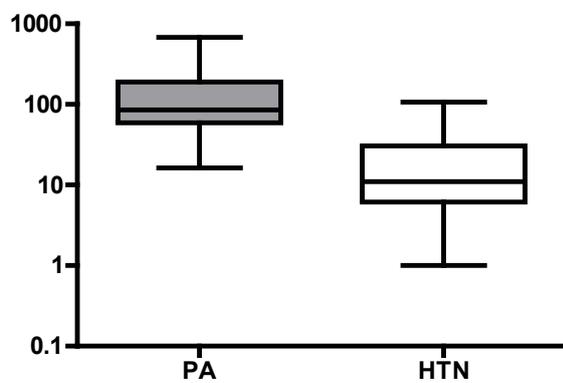


Abb. 21 Vergleich des Aldosteron-Renin-Quotienten der PA- und HTN-Patienten, dargestellt als Boxplot-Diagramm.

Der primäre Hyperaldosteronismus gilt als die häufigste Ursache einer sekundären Hypertonie, deren Vergesellschaftung mit Hypokaliämie und metabolischer Alkalose unter dem Begriff der Mineralocorticoid-Hypertonie zusammengefasst wird. Chronisch erhöhte Aldosteron-Spiegel führen zu *eutrophen remodelling Prozessen* der Widerstandsgefäße und kardialer Fibrose, deren klinisches Korrelat sich in Vorhofflimmern und dilatativer Kardiomyopathie widerspiegelt. Der Familiäre Hyperaldosteronismus Typ 1 (FHA-I) gilt als eine der häufigsten hereditären Formen der Mineralocorticoid-Hypertonie. Betroffene Patienten entwickeln bereits in den ersten Lebensdekaden schwere Verläufe einer arteriellen Hypertonie. Die Studien von Richard Lifton im Jahr 1992 legten den Grundstein für das Verständnis der genotypischen Aberration. Der Austausch der Promotoren von 11β -Hydroxylase und Aldosteronsynthase führt zu einer zirkadianen und Stress-abhängigen Sekretion von Aldosteron, die keinem negativen Feedback obliegt und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) außer Kraft setzt. Als therapeutisches Konzept wird daher eine Suppression der ACTH-Spiegel durch die tägliche Gabe von 0,125 mg – 0,75 mg Dexamethason empfohlen, in deren Konsequenz eine Inhibition der Expression des Hybridgen-Allels erfolgt (Stowasser et al. JCEM 2000). Als laboranalytische Verlaufskontrolle eignet sich die Bestimmung des Aldosteron-Renin-Quotienten (ARQ) und die Bestimmung der Hybridsteroidoide 18-Oxo-Cortisol bzw. 18-OH-Cortisol, um einen Therapieerfolg zu objektivieren. Unter Dexamethason korreliert die Serum-Aldosteron-Konzentration (SAK) positiv mit der Plasma-Renin-Konzentration (PRK). Eine konventionelle, antihypertensive Therapie wird in der Regel überflüssig, sofern keine Hypertonie bedingenden Begleiterkrankungen vorliegen. Es ist daher von großer klinischer Relevanz, den Familiären Hyperaldosteronismus Typ 1 zuverlässig zu diagnostizieren.

4.1 Diskussion der Methoden und Ergebnisse

In dieser Arbeit wird ein PCR-basiertes Assay etabliert, das die Hybridgen-Konstellation eines Merkmalsträgers erfassen kann. Eine Polymerase Kettenreaktion mit Primern, die die bekannten Bruchpunktstellen flankieren, dient als Grundlage. Im Verlauf dieser Arbeit stellte sich die Frage, wie zuverlässig die verwendeten Primerkombinationen tatsächlich sind. Bedenken traten hinsichtlich ihrer Spezifität auf, da die Gene *CYP11B1* und *CYP11B2* eine ausgeprägte Homologie aufweisen und die Gefahr von Fehlhybridisierungen verhältnismäßig hoch ist. In Frage stand konkret, ob Primer 1 spezifisch mit *CYP11B1* hybridisiert und nicht etwa mit einem äquivalenten Bereich von *CYP11B2*. In diesem Fall wäre die PCR nicht zur Diagnostik geeignet, da die Rate falsch positiver Ergebnisse mutmaßlich deutlich zu hoch wäre. Die Suche nach möglichen Amplifikaten ergibt, dass eine PCR mit Primerkombination 2+3 und humaner, genomischer DNA als Template potentiell fünf Amplifikate in einem

Größenbereich von 1 kb-10 kb liefert, wobei eine Mismatch-freie Hybridisierung nur den angestrebten *CYP11B2*-Abschnitt betrifft (siehe Anhang, Abb. 23). Da drei Amplifikate in einem Größenbereich von 4 kb mit einem mittleren Mismatch von 5 Basen zu erwarten sind, wird die Annealing-Temperatur mit 61° C auf ein hohes Niveau festgelegt. Für die Primerkombination 1+3 ist bei einer hohen Mismatch-Toleranz von 50% in diesem Größenbereich keine Amplifikation zu erwarten. Der Sequenzvergleich zwischen *CYP11B1* und *CYP11B2* (siehe Anhang, Abb. 24) zeigt eine Genhomologie von ca. 95%. Insbesondere an den Hybridisierungsstellen der in dieser Arbeit verwendeten Primer zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede in der Gensequenz. Um Fehlhybridisierungen in diesem Setting nachhaltig auszuschließen, werden Testkontrollen generiert. Die erfolgreiche Klonierung des Hybridgens war in Rückschau sehr schwierig, da die Menge an Ausgangsmaterial äußerst gering ist und Patienten mit einem Familiären Hyperaldosteronismus Typ I selten sind. Die Sequenzierung der klonierten Inserts bestätigen, dass die Primer bei einer Annealing Temperatur von 61°C spezifisch die Zielgene erfassen. Als Testkontrollen werden sie in der diagnostischen Umsetzung die Primerspezifität bestätigen und als Größenvergleich in der Elektrophorese dienen.

In der diagnostischen Umsetzung werden 61 Patienten auf das Vorliegen des pathognomonischen Hybridgens getestet. Als Ausgangsmaterial dient asserviertes EDTA-Blut, das bei -29° C gelagert wurde. Bei keinem der 59 Patienten, die sich im oben genannten Zeitraum in stationärer oder ambulanter Behandlung der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie des Universitätsklinikums Düsseldorf befanden, wird das chimäre Gen nachgewiesen. Beide blinden Positivkontrollen, die uns aus auswärtigen Zentren bereitgestellt wurden, zeigen ein positives Testergebnis. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den bisher veröffentlichten Studien zur Prävalenz des FHA-I. In der großangelegten PATOGEN-Studie von Mulatero et al. (2011) wurden 300 Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus auf das Vorliegen einer hereditären Mineralocorticoid-Hypertonie getestet. Neben der Bestimmung laborchemischer Parameter wie 18-oxo-Cortisol (18-oxo-F), 18-Hydroxy-Cortisol (18-OH-F) und des ARQs im Rahmen eines Dexamethason-Hemmtests wurden long-range-PCR und Southern-Blot als molekularbiologische Nachweismethoden der Hybridgen-Konstellation durchgeführt. Insgesamt wurde bei 2 Patienten ein FHA-I diagnostiziert, was einer Prävalenz von 0,66% entspricht. Die Untersuchung der Angehörigen ergab eine familiäre Häufung von 41% (21/51) (Mulatero et al. Hypertension 2011). In einer australischen Studie zur Subklassifizierung des Conn-Syndroms lag die Prävalenz des FHA-I bei 0,36 % (Gordon et al. Clin Exp Pharmacol Physiol 1991). Von 177 Patienten einer anderen Studie zeigten 4,5 % einen auffälligen Dexamethason-Suppressionstest (DST), jedoch konnte nur bei einem dieser Patienten das chimäre Gen nachgewiesen werden (0,1%) (Fogari et al. Hypertens Res 2007). Eine italienische Arbeitsgruppe führte im Jahr 1998 bei 117 Patienten mit

primärem Hyperaldosteronismus eine long-range-PCR zur Detektion des Hybridgens durch (Mulatero et al. J Clin Endocrinol 1998), eine norditalienische Arbeitsgruppe ging bei 277 nicht näher klassifizierten Hypertonikern eines norditalienischen Kollektivs nach demselben Prinzip vor (Pizzollo et al. J Human Hypertension 2005). In beiden Studien konnte bei keinem Patienten ein FHA-I nachgewiesen werden. Ein routinemäßiges Screening auf das Vorliegen eines FHA-I bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus ist in Zusammenschau der Datenlage sicherlich nicht zweckmäßig, da die Erkrankung selbst in einem ausgewählten Kollektiv selten ist. Dennoch sollte, insbesondere bei familiärer Häufung des Conn-Syndroms und kardiovaskulären Ereignissen in den ersten Lebensdekaden, an das Vorliegen eines FHA-I gedacht werden. Vor allem bei Kindern mit arterieller Hypertonie steigt die Prävalenz des FHA-I mit 3,1 % auf das ca. 10-fache an (Aglony et al. Hypertension 2011). In den betroffenen Familien der PATOGEN-Studie waren insgesamt 5 Todesfälle durch kardiovaskuläre Ereignisse in den ersten fünf Lebensdekaden zu beklagen. Die Notwendigkeit einer zuverlässigen Diagnosestellung des FHA-I ist der Tatsache geschuldet, dass eine konservative, antihypertensive Therapie keinen hinreichenden Erfolg verspricht. Insbesondere die Inhibitoren des Angiotensin-konvertierenden-Enzymes (ACE) zeigen wenig Wirkung, da das RAAS durch die Fehlregulation ohnehin supprimiert ist. Thiazid-Diuretika können normokaliämische Patienten rasch in eine hypokaliämische Alkalose führen (Gates et al. J Med Genet 1996). Neben Dexamethason als *quasi-kausale* Therapie sind Aldosteronantagonisten (z.B. Spironolacton) und Blocker des epithelialen Natriumkanals (z.B. Amilorid) zu empfehlen (Stowasser et al. Endocrinol Metab North Am. 2011). Die in der Diagnostik des Conn-Syndroms routinemäßig bestimmten Laborparameter wie der ARQ und das Kalium im Serum weisen bei Patienten mit FHA-I eine ausgeprägtere Varianz auf, insbesondere bei milderem Phänotyp und fortgeschrittenem Lebensalter (Carvajal et al. Hypertension 2011). Im Gegensatz dazu zeigten die insgesamt 23 betroffenen Patienten der PATOGEN-Studie ausnahmslos signifikant erhöhte 18-OH-F/18-oxo-F-Spiegel und auffällige Dexamethason-Suppressionstests. Als Suchtests könnten diese einfach zu bestimmenden Laborparameter erste Anhalte auf das Vorliegen eines FHA-I geben. Mittlerweile wurden allerdings weitere Umstände bekannt, die zu erhöhten Hybridsteroiden führen. Zum einen wurde eine weitere hereditäre Form des Conn-Syndroms beschrieben (Geller et al. JCEM 2008), zum anderen besteht die Möglichkeit einer Cortisol-Co-Produktion durch Aldosteronome, was auch in der Düsseldorfer Kohorte relevant zu sein scheint (Willenberg et al. Hypertens Res 2010, Späth et al. Eur J Endocrinol 2011). Bei der familiären Form wurde die Ursache in einer *KCNJ5*-Keimbahnmutation entdeckt (Choi et al. Science 2011), während sie bei den Cortisol-co-produzierenden Aldosteronomen in der Düsseldorfer Kohorte vermutlich nur als somatische Mutation auftritt (Choi et al. Science 2011, Åkerström et al. PLoS One 2012). Im Jahre 1997 untersuchten Litchfield et al. die Aussagekraft des Dexamethason-Suppres-

sionstests (DST) als Bestätigungsdiagnostik des FHA-I (Litchfield et al. J Clin Endocrinol Metab 1997). Der DST wurde mit molekularbiologischen Analysen bei insgesamt 24 Patienten (12 FHA-I positiv, 12 FHA-I negativ) verglichen und zeigte eine Sensitivität von 92 % und einer Spezifität von 100 % bei Patienten, die nach der Gabe von Dexamethason eine Serum-Aldosteron-Konzentration von unter 40 ng/l aufwiesen. In der Studie von Mulatero et al. hingegen konnte bei keinem der 117 untersuchten Patienten das Hybridgen nachgewiesen werden, obwohl 6 Patienten einen auffälligen DST zeigten (Mulatero et al. J Clin Endocrinol Metab 1998). Diese Daten stehen in Einklang mit der Studie von Fardella et al., in der nur 20 % der Patienten mit auffälligem DST tatsächlich Träger des Hybridgens waren (Fardella et al. J Clin Endocrinol Metab 2000). Sollte sich der Verdacht auf das Vorliegen eines FHA-I durch einen auffälligen DST und erhöhte Hybridsteroider erhärten, wäre als Bestätigungstest die molekularbiologische Diagnostik mit Hilfe des PCR-basierten Assays zu empfehlen. Hier konnten wir nun das veränderte Gen *CYP11B1/B2* eines betroffenen Patienten und das Wildtypgen *CYP11B2* klonieren und als Testkontrollen zum Nachweis einer sicheren und spezifischen Primerhybridisierung verwenden. Die Plasmide können wir auch für Arbeitsgruppen anbieten, die nicht die Möglichkeit besitzen, aus ihrem eigenen Patientenstamm betroffene Patienten zu rekrutieren.

Die Untersuchung betroffener Patienten aus den oben genannten Studien hat offengelegt, dass die phänotypische Ausprägung des FHA-I interindividuell variiert. Insbesondere die bekannten Merkmale einer Mineralocorticoid-Hypertonie im Sinne einer hypokaliämischen Alkalose sind oft nicht so ausgeprägt, stellenweise sind sie nur durch iatrogene Provokation mit einem Thiazid-Diuretikum nachzuweisen. In einigen Fällen unterscheiden sich betroffene Patienten klinisch und laborchemisch nicht von primären Hypertonikern (Stowasser et al. Endocrinol Metab North Am. 2011), stellenweise bleibt eine Hypertonie aus (Rich et al. Ann Intern Med 1992). Dennoch bietet die Mehrzahl betroffener Patienten ein breites Spektrum früh einsetzender, kardiovaskulärer Erkrankungen, insbesondere hämorrhagische, hypertensive Insulte (Stowasser et al. Endocrinol Metab North Am. 2011). Die Diskussion über die Ursachen der Variabilität des Phänotyps fokussiert zum jetzigen Zeitpunkt hauptsächlich intraindividuelle, gegenbalancierende Mechanismen betroffener Patienten im Sinne eines ausgereiften hypotensiven Systems und einer Hypersensitivität mineralocorticoider Zielzellen gegenüber Kalium (Gates et al. J Med Genet 1996). Die Gruppe um Carvajal beobachtete, dass insbesondere ARQ und Hypertonie in inverser Korrelation zum Lebensalter stehen (Carvajal et al. Hypertension 2011). Diese Daten lassen vermuten, dass solche Mechanismen in der Adoleszenz, vermutlich nach Beginn der Adrenarche, ausreifen. Inwieweit genotypische Aspekte in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen, ist bislang nicht hinreichend geklärt. Die interindividuelle Variabilität der Bruchpunktregion (Abb.

17) dürfte vermutlich keine vorrangige Rolle spielen, da sich Angehörige betroffener Familien mit einheitlichem Genotyp in phänotypischer Ausprägung unterscheiden können. Neben einer Identifizierung der Bruchpunktregion wäre gegebenenfalls eine Mutationsanalyse des chimären Promoters sinnvoll. Mutationen könnten die Sensitivität gegenüber ACTH-abhängigen Transkriptionsfaktoren (z.B. SF-1) verändern und sich klinisch in mildereren Verlaufsformen widerspiegeln.

4.2 Diskussion der Unterschiede zwischen den *CYP11B1*- und *CYP11B2*-Promotoren und deren Konsequenzen bezüglich des Aufbaus der Nebennierenrinde

Die Promoter der hoch homologen Gene *CYP11B1* und *CYP11B2* sind neben ihrer komplexen Regulation ein anschauliches Beispiel dafür, was der Austausch dieser Bereiche für die Funktionalität eines Organs bedeutet. Die Zellen der Nebennierenrinde formen histologisch abgrenzbare Zonen, in denen das intrazelluläre Milieu die Synthese spezifischer Hormone ermöglicht. Dabei ist bislang nicht eindeutig geklärt, welche übergeordneten Regulationsmechanismen diese Hormonspezifität der adrenalen Zellen steuert. Inspiriert durch ein älteres deutsches Anatomiebuch machte Peter Hornsby 1987 auf eine mögliche Regulation der adrenalen Organisation durch hormonelle Serumgradienten aufmerksam (Hornsby et al. J Steroid Biochem 1987). Bisher ging man von rein mechanistischen Faktoren aus, wobei postuliert wurde, dass ein Konzentrationsgradient, vermutlich durch ein Steroidhormon der Nebennierenrinde erzeugt, eine unterschiedliche Differenzierung der Nebennierenrindenzellen bewirkt. Die Hybridgenvariante *CYP11B1/B2* macht die Expression einer abgewandelten Aldosteron-Synthase abhängig von ACTH. Die Konsequenz dieser „dysregulatorischen Besonderheit“ gewährt Einblicke in die Physiologie der adrenalen Funktionalität: Das fehlgeleitete Crossing-over hat zur Folge, dass die Zonenspezifität der *CYP11B2*-Expression aufgehoben wird. Diese Tatsache wirft Fragen nach einem regulatorischen Gesamtzusammenhang auf. Eine parakrine Regulation durch endotheliale Wachstumsfaktoren ist für die Integrität des Organs bekannt (Willenberg et al. Horm Metab Res 2008). Im Hinblick auf die Genexpression von *CYP11B1* und *CYP11B2* ist sie aber vermutlich nicht von vorrangiger Bedeutung, da diese hauptsächlich durch Kalium sowie durch die Steuerhormone Angiotensin-II und Adrenocorticotropin beeinflusst wird. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, welcher Mechanismus die Zusammensetzung adrener Rezeptoren derart verändert, dass *CYP11B2* unter physiologischen Bedingungen ausschließlich in zG-Zellen und *CYP11B1* hauptsächlich in zF-/zR-Zellen exprimiert wird. Die kontinuierlich hohe Dichte der ACTH-Rezeptoren beantwortet diese Frage nicht (Reincke et al. J Endocrinol 1998). Das Verteilungsverhältnis der AT1-Rezeptoren hingegen weist eine stetige Dichteminderung

von der Kapsel bis zum Mark auf (Schuberth et al. *Clinical Endocrinology* 2001). Dort, wo AT1-Rezeptoren exprimiert werden, wird Aldosteron synthetisiert. Die Verschiebung des intrazellulären Gleichgewichtes in Richtung Calcium/Calmodulin wird nicht nur durch Aktivierung der G(q)-gekoppelten AT1R-Kaskade, sondern auch durch eine G(i)-gekoppelte Hemmung des ACTH-Signalweges (G(s)) möglich (Hausdorff et al. *Endocrinology* 1987, Neves et al. *Science* 2002). Die intrazelluläre Konzentration von cAMP wird so auf einem niedrigen Niveau gehalten. Des Weiteren exprimieren zG-Zellen in hohem Ausmaß die Adenylatcyclase Subtypen 5 und 6, die durch den Angiotensin-II getriggerten second-messenger Ca^{2+} inhibiert werden (Edwards et al. *J Pharmacol Exp Ther* 1993, Shen et al. *Endocrinology* 1997). Die AT1R-Kaskade antagonisiert den ACTH-Signalweg auf verschiedenen Ebenen. Die ausgeprägte Homologie der Gene *CYP11B1* und *CYP11B2* legt die Vermutung nahe, dass ursprünglich eine Gen-Duplikation auf Chromosom 8q einen bis dahin neuen Natrium-Retentions-Mechanismus hervorgebracht hat, der die Salz-Wasser-Homöostase an den Blutdruck bindet, unabhängig von Hypothalamus und Hypophyse. Unter phylogenetischem Blickpunkt könnte die Omnipräsenz des ACTH-Rezeptors darauf hindeuten, dass die Nebennierenrinden-Zelle mit einer zuvor angelegten Grundtendenz ausgerüstet ist, Progesteron in Glucocorticoide umzuwandeln und um somit als Endorgan einer Vasopressin-ACTH-Cortisol-Achse die Produktion der osmotisch wirksamen Glukose zu gewährleisten. Glucocorticoide wirken gleichermaßen mineralocorticoid, in den Zielzellen des Aldosterons jedoch mit einer deutlich niedrigeren Effektivität, da Cortisol dort hauptsächlich in inaktives Cortison umgewandelt wird. Ein akuter Anstieg von ACTH in Stresssituationen stimuliert beispielsweise kurzfristig die Expression von *CYP11B2*, vermutlich durch eine Sensitivität der NGFI-B-Promotoren gegenüber einigen durch ACTH-regulierten Effektorproteinen (beispielsweise CREB). NGFI-B-Proteine spielen eine herausragende Bedeutung in der Regulation der Aldosteronsynthese. Polymorphismen machen den Promoter von *CYP11B2* sensibel für einen G(s)-unabhängigen Regulationsmechanismus. Die G(q)-gekoppelte AT1-Rezeptor-Kaskade könnte als Modulation dieser adrenalen Grundtendenz interpretiert werden. Da die Osmo- und Blutdruckregulation effizienter über Natrium geregelt werden kann, ist die Entstehung des Mineralocorticoidrezeptors unbedingt sinnvoll gewesen. Diese Entwicklung machte die Regulation der Salz-Wasser-Homöostase unabhängig von Glukose und Energie. Im Rahmen dieser Arbeit wurde immer wieder die essenzielle Frage aufgeworfen: Welcher steuernde Faktor korreliert in seiner Veränderung entlang des adrenalen Cortex mit der Verteilung der AT1-Rezeptoren? Dabei entstand die Hypothese, dass die Antwort in der anatomischen Gestaltung des Organs liegt. Die radial angeordnete Blutversorgung der Nebenniere ermöglicht den Aufbau hormoneller Serumgradienten, wie anderen Orts ebenfalls beschrieben (Hornsby et al. *J steroid Biochem* 1987).

Entlang der arteriellen Gefäße, die von der Kapsel ausgehend systemisches, Glucocorticoid-

armes Blut in Richtung Mark leiten, baut sich ein ausgeprägter Glucocorticoid-Gradient auf. Die Serumkonzentration der Glucocorticoide Corticosteron und Cortisol steigt markwärts auf ein Hundertfaches des peripheren Spiegels. Dieser Cortisolgradient steht in inverser Korrelation zur Dichte der AT1-Rezeptoren und ist Folge des Verteilungsmusters adrener ACTH-Rezeptoren. Die Frage nach einem Gesamtzusammenhang lenkt den Blick auf die Regulationsmechanismen des AT1R-Promoters, der wiederum vier glucocorticoid response Elemente (GRE) enthält. Glucocorticoide hemmen die Expression des AT1R-Gens, da GRE 4 nach Cortisol-Bindung die *AP-1-site* des AT1R Promoter blockiert, die über c-FOS die Expression des Rezeptors stimuliert (Bogdarina et al. J Mol Endocrinol 2009, Andoka et al. Biochem Biophys Res Commun 1984). Eine effektive Antagonisierung des ACTH-Signalweges ist also dort möglich, wo Glucocorticoide am niedrigsten konzentriert sind. Die anatomische Gestaltung des Organs hat zur unmittelbaren Folge, dass der hemmende Einfluss von Cortisol auf die Expression der AT1-Rezeptoren kapselnah am geringsten ist, da die Zusammensetzung des arteriellen Blutes dort der Peripherie entspricht. Statistische Auswertungen der Nebennierenvenenkatheterisierungen von Patienten der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zeigten, dass die mittlere periphere Cortisolkonzentration an den Untersuchungstagen bei ca. 16 µg/dl lag (n=77), wohingegen in der linken Nebennierenvene mittlere Cortisolspiegel von ca. 200 µg/dl (n=77) gemessen wurden. Die kapselnahe Suppression der *CYP11B1* Expression hebt sich in Richtung Mark folglich immer weiter auf, mit der Folge einer immer stärker ausgeprägten Hemmung der AT1-Rezeptoren - ein fließender Prozess. Die Verschiebung des *CYP11B2/CYP11B1*-Expressions-Verhältnisses wäre demzufolge kein statischer Prozess, sondern könnte Folge des adrener Blutflusses sein (Dringenberg et al. Horm Metab Res 2013). Neben dem Verteilungsverhältnis adrener AT1-Rezeptoren und der Expression von *CYP11B2* steht die Aktivität der 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (*HSD3B2*) in inverser Korrelation zur Cortisol-Konzentration. Die Expression von *HSD3B2* wird ebenso wie *CYP11B2* über trans-Faktoren aus der NGFI-B-Familie stimuliert, die hauptsächlich über den Calcium/Calmodulin-Signalweg beeinflusst werden (Rainey et al. J Steroid Biochem Mol Biol. 2008). Die Verschiebung des Gleichgewichtes intrazellulärer *second-messenger* in Richtung cAMP/PKA inhibiert die Genexpression von *HSD3B2*. Da die Aktivität dieses Enzyms Steroid-Vorstufen in Richtung Mineralocorticoide und Glucocorticoide lenkt, gilt sie als Inhibitor der DHEA-Synthese. Eine effektive DHEA-Synthese ist dort möglich, wo Glucocorticoide am höchsten konzentriert sind, in diesem Fall in der zR. Cortisol erhält somit eine ausgesprochen hohe morphogenetische Potenz (Abb. 22). Der Konfiguration des adrener Blutflusses folgt ein „morphogenetisches Feld“, dessen histologisches und funktionelles Korrelat in der Zonierung der Nebennierenrinde zu finden ist. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass eine intakte Nebennierenrindenfunktion auch Voraussetzung für eine intakte

Nebennierenmarksfunktion ist (Haase et al. Endocr Dev 2011). Fluss-verändernde Zustände im adrenalen Stromgebiet (Hypertonie, Stenosen, etc.) könnten sich so unmittelbar auf die funktionelle Gestaltung des adrenalen Cortex auswirken. Als Peter Hornsby eine Regulation durch Hormongradienten diskutierte, waren die molekularen Grundlagen der Regulation adrenaler Schlüsselenzyme und Rezeptoren noch nicht bekannt.

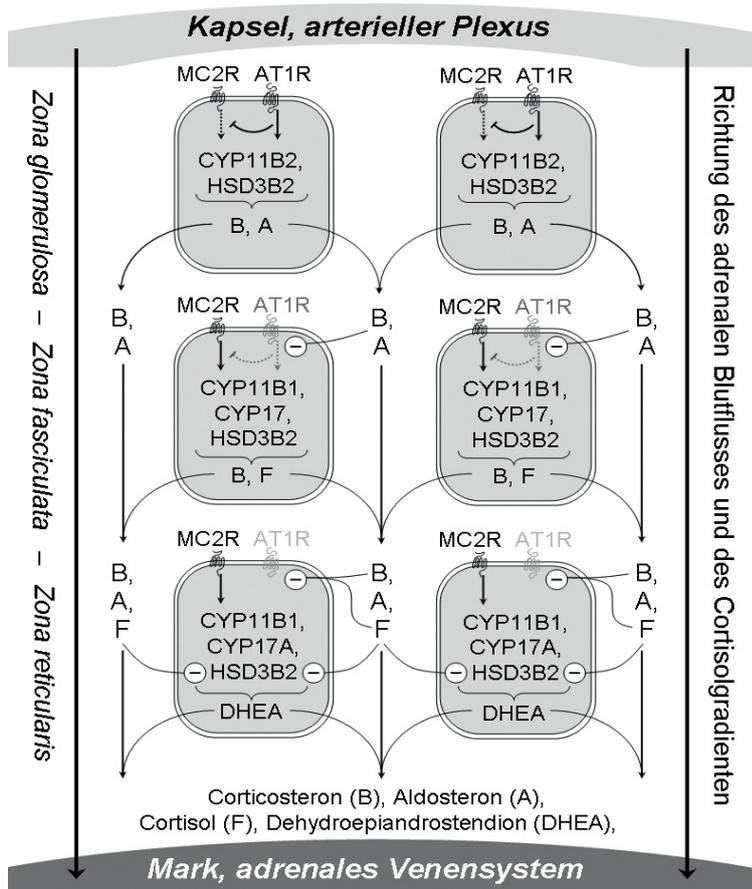


Abb. 22 Schematische Darstellung der Zonierungstheorie nach Dringenberg et al. Horm Metab Res 2013. Das Blut fließt zentripetal von außen nach innen. Die sezernierten Steroide bauen Gradienten auf, die die Expression von Rezeptoren und Enzymen beeinflussen. Abk.: MC2R: ACTH-Rezeptor, AT1R: Angiotensin-II-Rezeptor, B: Corticosteron, A: Aldosteron, F: Cortisol, DHEA: Dehydroepiandrosteron, HSD3B2: 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

Die Ergebnisse aktueller Studien deuten darauf hin, dass Cortisol tatsächlich über eine morphogenetische Potenz verfügt. Diese Theorie wird durch ältere Untersuchungen untermauert, in denen eine Verbreiterung der zG bei Mäusen beobachtet wurde, die einen hypofunktionellen Glucocorticoidrezeptor besitzen, obwohl bei den Tieren die ACTH-Spiegel erhöht waren (Cole et al. Genes Dev 1995). Diese Theorie steht außerdem im Einklang mit der Beobachtung, dass Patienten mit mutmaßlicher primärer Hypertonie signifikant erhöhte Aldosteron-Renin-Quotienten zeigen (Connell et al. Hypertension 2003, Mulatero et al. JCEM 2004, Willenberg et al. Eur J Clin Invest 2009, Tomaschitz et al. J Am Coll Cardiol 2010). Der erhöhte Aldosteron/Renin-Quotient als Ausdruck eines supprimierten RAAS bei Patienten mit *KCNJ-5*-Mutationen (Aldosteron-produzierende Adenome, FHA-

III) führt wiederum zu einem Wegfall der zG-spezifischen, AT1R-induzierten Hemmung des MC2R-Signalweges, was durch die erhöhten Konzentrationen der Hybridsteroiden objektivierbar ist. Ferner könnte die Hypothese ein Erklärungsansatz dafür sein, dass die Destruktion der Nebennierenrinde bei Patienten mit Autoimmunadrenalitis in der zG beginnt, in der niedrige Cortisol-Konzentrationen keinen nennenswerten immunsuppressiven Effekt auf autoreaktive T-Zellen darstellen. Beim Familiären Hyperaldosteronismus Typ 1 entsteht entsprechend dieser Hypothese ein Gleichgewicht zwischen dem Einfluss von Angiotensin und dem Einfluss von ACTH auf die Expression der Aldosteronsynthese. Hier gilt das Prinzip: Dort, wo ACTH Rezeptoren exprimiert werden, wird Aldosteron synthetisiert. Auf molekularer Ebene steht die modifizierte Aldosteronsynthese unter stimulierendem Einfluss von SF-1, mit weitreichenden Konsequenzen für den Gesamtorganismus. Die zonenspezifischen Expressionsmuster werden aufgehoben, die fein abgestimmte Gesamtregulation gerät aus dem Gleichgewicht. Die Kontrolle des enthemmten Chimärs *CYP11B1/B2* durch die Suppression seines unphysiologischen Stimulators kann als mechanistisches Beispiel für die therapeutischen Möglichkeiten monogentischer Erkrankungen aufgefasst werden.

Die Literaturrecherche und experimentelle Analyse bekannter Promoterpolymorphismen zweier verwandter Gene führte im Rahmen dieser Arbeit nicht nur zur Etablierung eines diagnostischen Tools, sondern auch zu einer Hypothese über die Entwicklung der Nebennierenrindenzonierung. Das Tool kann jederzeit zur Diagnostik des FHA-I im Rahmen der sekundären Hypertonieabklärung zum Einsatz kommen. Die Hypothese wiederum eröffnet neue Erklärungsmöglichkeiten zur phylogenetischen Entwicklung der Regulation des Salz-Wasser-Haushaltes und der dualen Regulation anderer Hormone durch G(s)- bzw. G(q)/G(i)-gekoppelte Rezeptoren.

Aglony M, Martínez-Aguayo A, Carvajal C, Campino C, Garcia H, Bancalari R, Bolte L, Avalos C, Loureiro C, Trejo P, Brinkmann K, Giadrosich V, Mericq V, Rocha A, Avila A, Perez V, Inostroza A, Fardella C (2011) Frequency of familial hyperaldosteronism type I in a hypertensive pediatric population: clinical and biochemical presentation. *Hypertension* 57, 1117–1121

Aguilera G, Kiss A, Lu A, Camacho C (1996) Regulation of adrenal steroidogenesis during chronic stress. *Endocr Res.* 22, 433-443

Åkerström T, Crona J, Delgado Verdugo A, Starker LF, Cupisti K, Willenberg HS, Knoefel WT, Saeger W, Feller A, Ip J, Soon P, Anlauf M, Alesina PF, Schmid KW, Decaussin M, Levillain P, Wängberg B, Peix JL, Robinson B, Zedenius J, Bäckdahl M, Caramuta S, Iwen KA, Botling J, Stålberg P, Kraimps JL, Dralle H, Hellman P, Sidhu S, Westin G, Lehnert H, Walz MK, Åkerström G, Carling T, Choi M, Lifton RP, Björklund P (2012) Comprehensive re-sequencing of adrenal aldosterone producing lesions reveal three somatic mutations near the KCNJ5 potassium channel selectivity filter. *PLoS One* 7(7):e41926

Andoka G, Chauvin MA, Saez JM, Morera AM (1984) Adrenocorticotropin regulates angiotensin II receptors in bovine adrenal cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 121, 441-447

Ansurudeen I, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Willenberg HS (2007) Endothelial cell-mediated regulation of aldosterone release from human adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol.* 265-266, 150-6

Bailey MA, Paterson JM, Hadoke PW, Wrobel N, Bellamy CO, Brownstein DG, Seckl JR, Mullins JJ (2008) A switch in the mechanism of hypertension in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *J Am Soc Nephrol.* 19, 47-58

Balaş M, Zosin I, Maser-Gluth C, Hermsen D, Cupisti K, Schott M, Schinner S, Knoefel WT, Scherbaum WA, Willenberg HS (2010) Indicators of mineralocorticoid excess in the evaluation of primary aldosteronism. *Hypertens Res.* 33, 850-6

Bassett MH, Zhang Y, White PC, Rainey WE (2000) Regulation of human aldosterone synthase and CYP11B1: comparing the role of the common CRE/Ad1 element. *Endocr Res.* 26, 941–951

- Bassett MH, Zhang Y, Clyne Y, White PC, Rainey WE** (2002) Differential regulation of aldosterone synthase and 11-hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. *J Mol Endocrinol.* 28, 125-35
- 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, 279–290
- Bassett MH, White PC, Rainey WE** (2004) The regulation of aldosterone synthase expression. *Molecular and Cellular Endocrinology* 217, 67–74
- Bird IM, Hanley NA, Word RA, Mathis JM, McCarthy JL, Mason JI, Rainey WE** (1993) Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion. *Endocrinology* 133, 1555–61
- Bogdarina IG, King PJ, Clark AJ** (2009) Characterization of the angiotensin (AT1b) receptor promoter and its regulation by glucocorticoids. *J Mol Endocrinol.* 2, 73-80
- 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, 1480-6
- Campbell SE, Diaz-Arias AA, Weber KT** (1992) Fibrosis of the human heart and systemic organs in adrenal adenoma. *Blood Press* 1, 149 –156
- Carey RM** (1982) Acute dopaminergic inhibition of aldosterone secretion is independent of angiotensin II and adrenocorticotropin. *J Clin Endocrinol Metab.* 54, 463–469
- Carvajal CA, Campino C, Martinez-Aguayo A, Tichauer JE, Bancalari R, Valdivia C, Trejo P, Aglony M, Baudrand R, Lagos CF, Mellado C, Garcia H, Fardella CE** (2011) A New Presentation of the Chimeric CYP11B1/CYP11B2 Gene With Low Prevalence of Primary Aldosteronism and Atypical Gene Segregation Pattern. *Hypertension* 59, 85-91
- Choi M, Scholl U, Yue P, Björklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, Jil W, Cho Y, Patel A, Men CJ, Lolis E, Wisgerhof MV, Geller DS, Mane S, Hellman P, Westin G, Akerström G, Wang W, Carling T, Lifton RP** (2011) K⁺ Channel Mutations in Adrenal Aldosterone-Producing Adenomas and Hereditary Hypertension. *Science* 331, 768-772

Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Kriegstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K, Schütz G (1995) Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* 9, 1608-21

Condon JC, Pezzi V, Drummond BM, Yin S, Rainey WE (2002) Calmodulin-dependent kinase I regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase. *Endocrinology* 143, 3651–3657

Connell JM, Fraser R, MacKenzie S, Davies E (2003) Is altered adrenal steroid biosynthesis a key intermediate phenotype in hypertension? *Hypertension* 41, 993-9

Dammer EB, Leon A, Sewer MB (2007) Coregulator exchange and sphingosine-sensitive cooperativity of steroidogenic factor-1, general control non-derepressed 5, p54, and p160 coactivators regulate cyclic adenosine 3,5-mono-phosphatedependent cytochrome P450c17 transcription rate. *Mol Endocrinol.* 21, 415–438

Denner K, Rainey WE, Pezzi V, Bird IM, Bernhardt R, Mathis JM (1996) Differential regulation of 11 beta-hydroxylase and aldosterone synthase in human adrenocortical H295R cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 121, 87–91

Dringenberg T, Schwitalla M, Haase M, Scherbaum WA, Willenberg HS (2013) Control of CYP11B2/CYP11B1 expression ratio and consequences for the zonation of the adrenal cortex. *Horm Metab Res.* 45, 81-5

Dringenberg T, Sorokina M, Ehlers M, Dekomien G, Haase M, Schulze E, Quinkler M, Rump LC, Schott M, Willenberg HS (2016) Evaluation of a Recently Established Test for Familial Hyperaldosteronism Type 1. *Horm Metab Res.* 48, 865-868

Edwards CR, Stewart PM (1991) The cortisol-cortisone shuttle and the apparent specificity of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 39, 859-65

Edwards RM, Stack EJ (1993) Angiotensin II inhibits glomerular adenylate cyclase via the angiotensin II receptor subtype 1 (AT1). *J Pharmacol Exp Ther.* 266, 506-10

Fardella CE, Mosso L, Gómez-Sánchez C, Cortés P, Soto J, Gómez L, Pinto M, Huete

A, Oestreicher E, Foradori A, Montero J (2000) Primary hyperaldosteronism in essential hypertensives: prevalence, biochemical profile, and molecular biology. *J Clin Endocrinol Metab.* 85, 1863-7

Farquharson CAJ, Struthers AD (2000) Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure. *Mol Cell Endocrinol.* 121, 87–91

Fogari R, Preti P, Zoppi A, Rinaldi A, Fogari E, Mugellini A (2007) Prevalence of primary aldosteronism among unselected hypertensives patients: a prospective study based on the use of an aldosterone/renin ratio above 25 as a screening test. *Hypertens Res.* 30, 11-7

Funder JW, Carey RM, Fardella C, Gomez-Sanchez CE, Mantero F, Stowasser M, Young WF Jr, Montori VM; Endocrine Society (2008) Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 93, 3266-81

Gates LJ, MacConnachie AA, Lifton RP, Haites NE, Benjamin N (1996) Variation of phenotype in patients with GRA. *J Med Genet.* 33, 25–28

Geller DS, Zhang J, Wisgerhof MV, Shackleton C, Kashgarian M, Lifton RP (2008) A novel form of human mendelian hypertension featuring nonglucocorticoid-remediable aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 93, 3117–3123

Gordon RD, Stowasser M, Klemm SA, Tunny TJ (1995) Primary aldosteronism--some genetic, morphological, and biochemical aspects of subtypes. *Steroids* 60, 35-41

Gordon RD, Stowasser M, Tunny TJ, Klemm SA, Finn WL, Krek AL (1991) Clinical and pathological diversity of primary aldosteronism, including a new familial variety. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 18, 283–286

Gupta V. (2011) Mineralocorticoid hypertension. *Indian J Endocrinol Metab.* 4, 298-312

Halperin F, Dluhy RG (2011) Glucocorticoid-remediable aldosteronism. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 40, 333-341

Haase M, Willenberg HS, Bornstein SR (2011) Update on the corticomedullary interaction in the adrenal gland. *Endocr Dev.* 20, 28-37

Hammer GD, Krylova I, Zhang Y, Darimont BD, Simpson K, Weigel NL, Ingraham HA (1999) Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol Cell.* 3, 521–526

Hausdorff WP, Sekura RD, Aguilera G, Catt KJ (1987) Control of aldosterone production by angiotensin II is mediated by two guanine nucleotide regulatory proteins. *Endocrinology* 120, 1668–1678

Hiramatsu K, Yamada T, Yukimura Y (1981) A screening test to identify aldosterone-producing adenoma by measuring plasma renin activity: results in hypertensive patients. *Arch Intern Med.* 141, 1589–1593

Hoivik EA, Lewis AE, Aumo L, Bakke M (2010) Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1). *Mol Cell Endocrinol.* 315, 27-39

Holland OB, Carr BR (1993) Modulation of aldosterone synthase messenger ribonucleic acid levels by dietary sodium and potassium and by adrenocorticotropin. *Endocrinology* 132, 2666–2673

Hornsby P (1987) Physiological and pathological effects of steroids on the function of the adrenal cortex. *J steroid Biochem.* 27, 1161-1171

Imachi H, Muraio K, Cao WM, Muraoka T, Nishiuchi T, Dobashi H, Hosomi N, Iwama H, Ishida T (2008) The prolactin regulatory element-binding regulates of the 11beta-hydroxylase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 376, 531-5

Inaoka Y, Yazawa T, Uesaka M, Mizutani T, Yamada K, Miyamoto K (2008) Regulation of NGFI-B/Nur77 gene expression in the rat ovary and in leydig tumor cells MA-10. *Mol Reprod Dev.* 75, 931-9

Jackson RV, Lafferty A, Torpy DJ, Stratakis C (2002) New genetic insights in familial hyperaldosteronism. *Ann N Y Acad Sci.* 970, 77-88

Jonsson JR, Klemm SA, Tunny TJ, Stowasser M, Gordon RD (1996) A new genetic test

for familial hyperaldosteronism type I aids in the detection of curable hypertension. *Biochem Biophys Res Commun.* 207, 565–571

Kamrath C, Maser-Gluth C, Haag C, Schulze E. (2011) Diagnosis of glucocorticoid-remediable aldosteronism in hypertensive children. *Horm Res Paediatr.* 76, 93-8

Komukai K, Mochizuki S, Yoshimura M (2010) Gender and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Fundam Clin Pharmacol.* 24, 687-98

Kramer RE, Rainey WE, Funkenstein B, Dee A, Simpson ER, Waterman MR (1984) Induction of synthesis of mitochondrial steroidogenic enzymes of bovine adrenocortical cells by analogs of cyclic AMP. *J Biol Chem.* 259, 707–713

Le T, Schimmer BP (2001) The regulation of MAPKs in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *Endocrinology* 142, 4282–4287

Lee IS, Kim SY, Jang HW, Kim MK, Lee JH, Lee YH, Jo YS (2010) Genetic analyses of the chimeric CYP11B1/CYP11B2 gene in a Korean family with glucocorticoid-remediable aldosteronism. *J Korean Med Sci.* 25, 1379-83

Lehnert H (2003) Rationelle Diagnostik und Therapie in der Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel. Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie Kap.5, S.142-154, 2. Auflage, Thieme Verlag

Lewis AE, Rusten M, Hoivik EA, Vikse EL, Hansson ML, Wallberg AE, Bakke M (2008) Phosphorylation of steroidogenic factor 1 is mediated by cyclindependent kinase 7. *Mol Endocrinol.* 22, 91–104

Li LA, Chang YC, Wang CJ, Tsai FY, Jong SB, Chung BC (2004) Steroidogenic factor 1 differentially regulates basal and inducible steroidogenic gene expression and steroid synthesis in human adrenocortical H295R cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 91, 11–20

Litchfield WR, New MI, Coolidge C, Lifton RP, Dluhy RG (1997) Evaluation of the dexamethasone suppression test for the diagnosis of glucocorticoid-remediable aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 82, 3570-3

Litchfield WR, Anderson BF, Weiss RJ, Lifton RP, Dluhy RG (1998) Intracranial aneu-

rism and hemorrhagic stroke in glucocorticoid-remediable aldosteronism. *Hypertension* 31, 445–450

Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Gutkin M, Fallo F, Gill JR, Feld L, Ganguly A, Laidlaw JC (1992) Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. *Nat Genet.* 2, 66–74

Macconnachie AA, Kelly KF, Mcnamara A, Loughlin S, Gates LJ, Inglis GC, Jamieson A, Connel JMC, Haites NE (1998) Rapid Diagnosis and Identification of Cross-Over Sites in Patients with Glucocorticoid Remediable Aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 83, 4328-31

Matthews RP, Guthrie CR, Wailes LM, Zhao X, Means AR, McKnight GS (1994) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB dependent gene expression. *Mol Cell Biol.* 14, 6107–6116

Mckenzie CA, Keavney B, Forrester T, Julier C, Ratcliffe PJ (2000) Screening for the GRA mutation in Jamaica. *J Hum Hypertens.* 14, 157–158

Miller WL (2008) Steroidogenic enzymes. *Endocr Dev.* 13, 1-18

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, 1243–1248

Mornet E, Dupont J, Vitek A, White PC (1989) Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11) beta). *J Biol Chem.* 264, 20961–20967

Mosso LM, Carvajal CA, Maiz A, Ortiz EH, Castillo CR, Artigas RA, Fardella CE (2007) A possible association between primary aldosteronism and a lower beta-cell function. *J Hypertens.* 25, 2125-30

Mulatero P (1998) Diagnosis of glucocorticoid-remediable aldosteronism in primary aldosteronism: aldosterone response to dexamethasone and long polymerase chain reaction for chimeric gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 83, 2573-2575

Mulatero P, Curnow KM, Aupetit-Faisant B, Foekling M, Gomez-Sanchez C, Veglio

F, Jeunemaitre X, Corvol P, Pascoe L (1998) Recombinant CYP1B Genes encode enzymes that can catalyze conversion of 11-Deoxycortisol to Cortisol, 18-Hydroxycortisol and 18-Oxocortisol. *J Clin Endocrinol and Metab.* 83, 3996-4001

Mulatero P, di Cella SM, Williams TA, Milan A, Mengozzi G, Bonelli S, Chiandussi L, Gomez-Sanchez CE, Veglio F (2002) Glucocorticoid remediable Aldosteronism. Low morbidity and mortality in a four-generation italian pedigree. *J Clin Endocrinol Metab.* 87, 3187–3191

Mulatero P, Tizzani D, Viola A, Bertello C, Monticone S, Mengozzi G, Schiavone D, Williams TA, Einaudi S, La Grotta A, Rabbia F, Veglio F (2011) Prevalence and Characteristics of Familial Hyperaldosteronism: The PATOGEN Study (Primary Aldosteronism in TORino-GENetic forms). *Hypertension* 58, 797-803

Mulrow PJ (1999) Angiotensin II and aldosterone regulation. *Regul Pept.* 80, 27-32

Neves SR, Ram PT, Iyengar R (2002) G protein pathways. *Science* 296, 1636–1639

Nogueira EF, Xing Y, Morris CA, Rainey WE (2009) Role of angiotensin II-induced rapid response genes in the regulation of enzymes needed for aldosterone synthesis. *J Mol Endocrinol.* 42, 319–330

Nogueira EF, Rainey WE (2010) Regulation of Aldosterone Synthase by Activator Transcription Factor/cAMP Response Element-Binding Protein Family Members. *Endocrinology* 151, 1060-1070

Ouyang J, Hu D, Wang B, Shi T, Ma X, Li H, Wang X, Zhang X (2011) Differential effects of down-regulated steroidogenic factor-1 on basal and angiotensin II-induced aldosterone secretion. *J Endocrinol Invest.* 34, 671-5

Pascoe L, Curnow KM, Slutsker L, Connel JM, Speiser PW, New MI, White PC (1992) Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism results from hybrid genes created by unequal crossovers between CYP11B1 and CYP11B2. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 8327-8331

Porzionato A, Macchi V, Rucinski M, Malendowicz LK, De Caro R (2010) Natriuretic peptides in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Int Rev Cell Mol Biol.*

280, 1-39

Pizzolo F, E Trabetti, P Guarini, P Mulatero, A Ciacciarelli, G S Blengio, R Corrocher and O Olivieri (2005) Glucocorticoid remediable aldosteronism (GRA) screening in hypertensive patients from a primary care setting. *J Hum Hypertens* 19, 325–327

Rainey WE, Nakamura Y (2008) Regulation of the adrenal androgen biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 108, 281-6

Reincke M, Beuschlein F, Menig G, Hofmockel G, Arlt W, Lehmann R, Karl M, Allolio B. (1998) Localization and expression of adrenocorticotrophic hormone receptor mRNA in normal and neoplastic human adrenal cortex. *J Endocrinol.* 156, 415-23

Rich GM, Ulick S and Cook S (1992) Glucocorticoid-remediable aldosteronism in a large kindred: clinical spectrum and diagnosis using a characteristic biochemical phenotype. *Ann Intern Med.* 116, 813–820

Rincon Garriz JM, Suarez C, Capponi AM (2009) c-Fos mediates angiotensin II-induced aldosterone production and protein synthesis in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 150, 1294-302

Rizzoni D, Porteri E, Castellano M, Bettoni G, Muiesan ML, Tiberio G, Giulini SM, Rossi GP, Bernini G, Agabiti-Rosei E (1998) Endothelial dysfunction in hypertension is independent from the etiology and from vascular structure. *Hypertension* 31, 335–341

Robert VC, Heymes C, Silvestre JS (1999) Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension* 33, 981-986

Romero DG, Rilli S, Plonczynski MW, Yanes LL, Zhou MY, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE (2007) Adrenal transcription regulatory genes modulated by angiotensin II and their role in steroidogenesis. *Physiol Genomics* 19, 30

Rossi G, Rossi A, Sacchetto A, Pavan E, Pessina AC (1995) Hypertensive cerebrovascular disease and the renin-angiotensin system. *Stroke* 26, 1700 –1706

Rossi GP, Sacchetto A, Visentin P, Canali C, Graniero GR, Palatini P, Pessina AC (1996) Changes in left ventricular anatomy and function in hypertension and primary aldostero-

nism. *Hypertension* 27, 1039–1045

Sackmann S, Lichtenauer U, Shapiro I, Reincke M, Beuschlein F (2011) Aldosterone producing adrenal adenomas are characterized by activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) dependent pathways. *Horm Metab Res.* 43, 106-11

Schuberth B, Fassnacht M, Bescuhlein F, Zenkert S, Allolio B, Rickert M (2001) Angiotensin II type 1 receptor and ACTH receptor expression in human adrenocortical neoplasmas. *Clinical Endocrinology* 54, 627-632

Sewer MB, Waterman MR (2003) CAMP-dependent protein kinase enhances CYP17 transcription via MKP-1 activation in H295R human adrenocortical cells. *J Biol Chem.* 278, 8106–8111

Shen T, Suzuki Y, Poyard M, Best-Belpomme M, Defer N, Hanoune J (1997) Localization and differential expression of adenylyl cyclase messenger ribonucleic acids in rat adrenal gland determined by in situ hybridization. *Endocrinology* 138, 4591–4598

Sirianni R, Nogueira E, Bassett MH, Carr BR, Suzuki T, Pezzi V, Andò S, Rainey WE (2010) The AP-1 family member FOS blocks transcriptional activity of the nuclear receptor steroidogenic factor 1. *J Cell Sci.* 123, 3956-3965

Spät A, Hunyady L (2004) Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev.* 84, 489-539

Späth M, Korovkin S, Antke C, Anlauf M, Willenberg HS (2011) Aldosterone- and cortisol-co-secreting adrenal tumors: the lost subtype of primary aldosteronism. *Eur J Endocrinol.* 164, 447–455

Stowasser M, Bachmann AW, Huggard PR, Rossetti TR, Gordon RD (2000) Treatment of familial hyperaldosteronism type I: only partial suppression of adrenocorticotropin required to correct hypertension. *J Clin Endocrinol Metab.* 85, 3313-3318

Stowasser M, Pimenta E, Gordon RD (2011) Familial or genetic primary aldosteronism and Gordon syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 40, 343-68

Strauch B, Zelinka T, Hampf M, Bernhardt R, Widimsky J Jr (2003) Prevalence of pri-

mary hyperaldosteronism in moderate to severe hypertension in the Central Europe region. *J Hum Hypertens.* 17, 349-52

Sun Y, Ramires FJ, Weber KT (1997) Fibrosis of arteria and great vessels in response to angiotensin II or aldosterone infusion. *Cardiovasc Res.* 35, 138-147

Sutherland DJ, Ruse JL, Laidlaw JC (1966) Hypertension, increased aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone. *Can Med Assoc J.* 95, 1109 –1119

Switalska I, Chodakowska HJ, Januszewicz W (1997) Evaluation of plasma aldosterone to plasma renin activity ratio in patients with primary aldosteronism. *J Hum Hypertens.* 11, 373–378

Taymans SE, Pack S, Pak E (1998) Human CYP11B2 (aldosterone synthase) maps to chromosome 8q24.3. *J Clin Endocrinol Metab.* 83, 1033–1036

Tomaschitz A, Maerz W, Pilz S, Ritz E, Scharnagl H, Renner W, Boehm BO, Fahrleitner-Pammer A, Weihrauch G, Dobnig H (2010) Aldosterone/renin ratio determines peripheral and central blood pressure values over a broad range. *J Am Coll Cardiol.* 55, 2171-80

Vonend O, Altenhenne C, Büchner NJ, Dekomien G, Maser-Gluth C, Weiner SM, Sellin L, Hofebauer S, Epplen JT, Rump LC (2007) A German family with glucocorticoid-remediable aldosteronism. *Nephrol Dial Transplant.* 22, 1123–1130

Wang XL, Bassett M, Zhang Y, Yin S, Clyne C, White PC, Rainey WE (2000) Transcriptional Regulation of Human 11 β -Hydroxylase (hCYP11B1). *Endocrinology* 141, 3587-3594

Willenberg HS, Schinner S, Ansurudeen I. (2008) New mechanisms to control aldosterone synthesis. *Horm Metab Res.* 40, 435-41

Willenberg HS, Kolentini C, Quinkler M, Cupisti K, Krausch M, Schott M, Scherbaum WA (2009) The serum sodium to urinary sodium to (serum potassium)² to urinary potassium (SUSPPUP) ratio in patients with primary aldosteronism. *Eur J Clin Invest.* 39, 43-50

Willenberg HS, Späth M, Maser-Gluth C, Engers R, Anlauf M, Dekomien G, Schott M, Schinner S, Cupisti K, Scherbaum WA (2010) Sporadic solitary aldosterone- and cortisol-

co-secreting adenomas: endocrine, histological and genetic findings in a subtype of primary aldosteronism. *Hypertens Res.* 33, 467-72

Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J (1991) Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* 252, 1296–1300

Winnay JN, Hammer GD (2006) Adrenocorticotrophic hormone-mediated signaling cascades coordinate a cyclic pattern of steroidogenic factor 1-dependent transcriptional activation. *Mol Endocrinol.* 20, 147–166

Wolf-Maier K, Cooper R, Banegas J, Giampaoli S, Hense H, Joffres M et al (2003) Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *JAMA* 289, 2363–2369

Wu VC, Yang SY, Lin JW, Cheng BW, Kuo CC, Tsai CT, Chu TS, Huang KH, Wang SM, Lin YH, Chiang CK, Chang HW, Lin CY, Lin LY, Chiu JS, Hu FC, Chueh SC, Ho YL, Liu KL, Lin SL, Yen RF, Wu KD; TAIPAI Study Group (2011) Kidney impairment in primary aldosteronism. *Clin Chim Acta.* 412, 1319-25

Wyckoff JA, Seely EW, Hurwitz S, Anderson BF, Lifton RP, Dluhy RG (2000) Glucocorticoid-remediable aldosteronism and pregnancy. *Hypertension* 35, 668–672

Yokota K, Ogura T, Kishida M, Suzuki J, Otsuka F, Mimura Y, Oishi T, Hirata M, Tobe K, Makino H (2001) Japanese family with glucocorticoid-remediable aldosteronism diagnosed by long-polymerase chain reaction. *Hypertens Res.* 24, 589-94

6.1 Primerblast

Primer 2 (CYP11B2-fw) 5' - TCC TTC ATC TAC CTT TGG CTG GGG - 3' (Tm: 57,9° C)
 Primer 3 (CYP11B2-rv) 5' - GAG TCC TCC AGC TGC CTC TCA ACC - 3' (Tm: 60.53° C)

NC_000008.10 Homo sapiens chromosome 8, GRCh37.p5 Primary Assembly
 product length = 4085
 Features associated with this product: cytochrome P450 11B2, mitochondrial precursor

Forward primer	1	TCCTTCATCTACCTTTGGCTGGGG	24
Template	143999417	143999394
Reverse primer	1	GAGTCCTCCAGCTGCCTCTCAACC	24
Template	143995333	143995356

NC_000001.10 Homo sapiens chromosome 1, GRCh37.p5 Primary Assembly
 product length = 2523

Forward primer	1	TCCTTCATCTACCTTTGGCTGGGG	24
Template	196663955C....T...T.A.....	196663978
Forward primer	1	TCCTTCATCTACCTTTGGCTGGGG	24
Template	196666477C.C..T...T.A.....	196666454

NC_000004.11 Homo sapiens chromosome 4, GRCh37.p5 Primary Assembly
 product length = 3902

Forward primer	1	TCCTTCATCTACCTTTGGCTGGGG	24
Template	74771416C..T...T.A.....	74771439
Forward primer	1	TCCTTCATCTACCTTTGGCTGGGG	24
Template	74775317C.C..T...T.A.....	74775294

product length = 4077

Forward primer	1	TCCTTCATCTACCTTTGGCTGGGG	24
Template	46234220C.C..T...T.A.....	46234243
Forward primer	1	TCCTTCATCTACCTTTGGCTGGGG	24
Template	46238296C.C..T...T.A.....	46238273

NC_000002.11 Homo sapiens chromosome 2, GRCh37.p5 Primary Assembly
 product length = 4419

Forward primer	1	TCCTTCATCTACCTTTGGCTGGGG	24
Template	44817717C.C..T...T.A.....	44817740
Forward primer	1	TCCTTCATCTACCTTTGGCTGGGG	24
Template	44822135C.C..T...T.A.....	44822112

Abb. 23 Primer Blast, pubmed.com. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der potentiellen Amplifikate mit der Primer-Kombination 2/3. Bei humaner, genomischer DNA als Template sind fünf Amplifikate zu erwarten, wobei eine Mismatch-freie Hybridisierung nur das *CYP11B2*-Gen betrifft.

6.2 Sequenzvergleich zwischen CYP11B2 (subject) und CYP11B1 (Query)

ref|NG_007954.1| Homo sapiens cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1 (CYP11B1=Query, CYP11B2=Sbjct), RefSeqGene on chromosome 8
Length=14464

GENE ID: 1584 CYP11B1 | cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1
[Homo sapiens] (Over 10 PubMed links)

1. Score = 5805 bits (3143)

(Query 4867-8701, Sbjct 4871-8701)

Identities = 3638/3868 (94%), Gaps = 70/3868 (2%)
Strand=Plus/Plus

2. Score = 1971 bits (1067)

(Query 10483-12080, Sbjct 10065-11657)

Identities = 1445/1621 (89%), Gaps = 51/1621 (3%)
Strand=Plus/Plus

3. Score = 1716 bits (929)

(Query 9269-10349, Sbjct 8820-9897)

Identities = 1034/1084 (95%), Gaps = 9/1084 (1%)
Strand=Plus/Plus

Abb. 24 Sequenzvergleich zwischen den Genen CYP11B1 und CYP11B2. Die Basensequenzen von CYP11B2 und CYP11B1 werden miteinander verglichen. Nach Gene Bank[®] hybridisiert Primer 1 an Nucleotidposition 4848-4871 (NG_007954), Primer 2 an Nucleotidposition 4843-4866 und Primer 3 an Nucleotidposition 8904-8927 (NG_008374). Die Stellen größter Homologie sind in der Abbildung aufgelistet. Die Position der Hybridisierung liegen außerhalb dieser Bereiche.

CYP11B2, Sequenz ab Primer 2

```

1   CTCTGAGAGTCTCAGGCAGGTCAGAGCCAGTTCTCCCATGACGTGATATGTTTCCAGAG 60
61  CAGGTTCCCTGGGTGAGATAAAAAGGATTTGGGCTGAACAGGGTGGAGGGAGCATTGGAATG 120
121 GCACTCAGGGCAAAGGCAGAGGTGTGCGTGGCAGCGCCCTGGCTGTCCCTGCAAAGGGCA 180
181 CGGCACTGGGCACTAGAGCCGCTCGGGCCCCCTAGGACGGTGTGCGGTTTGAAGCCATG 240
241 CCCCAGCATCCAGGCAACAGGTGGCTGAGGCTGCTGCAGATCTGGAGGGAGCAGGGTTAT 300
301 GAGCACCTGCACCTGGAGATGCACCAGACCTTCCAGGAGCTGGGGCCATTTTTCAGGTAA 360
361 AGCCCTCCCTGGCCCTCGCTGGGAACACCCAGATCCCTGCCCTGCTGCCCAGGACCCCTG 420
421 CCAGGCACTCAGCACTGCCATTCCCAGCAGGTCGCCGCACTCTGCATCCTTTGGAGGATG 480
481 GGAAGGAGTGACGACATGCTGGTCTGTGGTGTGCCAGGGCAGGGGATAGTGCAGAGA 540
541 AAACCCCAGCTCACTGCAGAGAGGGCAGGACT 572

```

CYP11B2, Sequenz ab Primer 3

```

1   AGTGGGGACAGAGCTGCTGTGTGTCCAGGGCCTCATCCAACCTTTCTTCCAGCCTGGAGCA 60
61  TGGATCCCCACACAGGTAACCTGCAAACCTCAGTCTCATGTGAGGGGGAGCTCACATTTCCC 120
121 CTCCCCTGCAAATCTCGTCCCTTAACAAAGGAGGGGGAAAGGCTGAGGGCAACAGAAATGT 180
181 GGGCCTGTAGCCTGGGGATGGGAACGTGGGTGCCGTGTGGCATTGGCAGGAGTGCCT 240
241 GGGAGGCAGGCTTGGCATCACCCCTCTCTGGGTGGGGCTGGTTGCTGGCCTGACCGTGTCC 300
301 ACGTCCCTGCAGTGAGTTCATAGAGTTGGCCTTGATGGCTTCTAGTGACAGTTCCGCC 360
361 TTCAACAGGAGCTCTGCCACGATGCCTGTGTAGTGTGAGGGCGGTTGAAGGCCAGTTC 420
421 TGGTAGATTTCTGGATACAGTTGTACCTGTCCAGGGAGCAGGGGACAGCCCCCAGAC 480
481 CTTGGTGTGGGAAGCATCCTTTCAGTGTCTCCTCCTGCCAGACTGCCCCGACGCCCAA 540
541 ATCTCCCTGCTCTCATCCCA 560

```

CYP11B1/B2, Sequenz ab Primer 1

```

1   CCTCGGTCTCTCAGGCAGATCCAGGGCCAGTTCTCCCATGACGTGATCCCTCTCGAAGGC 60
61  AAGGCACCAGGCAAGATAAAAAGGATTTGCAGCTGAACAGGGCGGAGGGAGCATTGGAATGG 120
121 CACTCAGGGCAAAGGCAGAGGTGTGCATGGCAGTGCCCTGGCTGTCCCTGCAAAGGGCAC 180
181 AGGCACTGGGCACGAGAGCCCGGGTCCCCAGGACAGTGTGCTGCCCTTTGAAGCCATGC 240
241 CCGGGCGTCCAGGCAACAGGTGGCTGAGGCTGCTGCAGATCTGGAGGGAGCAGGGTTATG 300
301 AGGACCTGCACCTGGAAGTACACCAGACCTTCCAGGAACCTAGGGCCCATTTTTCAGGTAAA 360
361 GCCCTCCCTGGCCCTCGCTGGGAACACCCAGAGCCCTGCCCTTGCTGCCCAGCCCTGC 420
421 CGGGCACTCAGCACTGCCATTCCCAGCAGGTCCCAGGCACTCTGCATCCTTTGGAAGATGG 480
481 GGAAGGAGTGCAGCACGTGCTGGTCTGTGGCGTGCCAGGGCAGGGGATGGTGCAGAGCA 540
541 AATCCCAGCTCGTGCAGAGAGGGCAGGACTCAGAGGCACTGAAGTTAAGAGGTTCCGGG 600
601 CAGTCAGCAAGAGGGCTTTAGCTGTGAAGCCGCTAATCCAGGAGAGGGGAGGGTGGACAG 660
661 GAGACACTTTGGATTGGGACTGCAGGGTGGGGCTAGCGGGGACATGGTCCCATCCAGCAC 720
721 GGCCTCGTGCTTGGCCCCACAGGTACGACTTGGGAGGAGCAGGCATGGTGTGTGTGATGC 780
781 TGGCGGAGGACGTGGAGAAGCTGCAACAGGTGGACAGCCTGCATCCCCACAGGATGAGCC 840
841 TGGAGCCCTGGGTGGCCTACAGACAACATCGTGGGCACAAATGTGGCGTGTCTTGTCTGT 900
901 AAG 903

```

CYP11B1/B2, Sequenz ab Primer 3

```

1   CTTTCCAGTGGGGACAGAGCTGCTGTGTGTCCAGGGCCTCATCCAACCTTTCTTCCNNCCT 60
61  GGAGCATGGATCCCCACACAGGTAACCTGCAAACCTCAGTCTCATGTGAGGGGGAGCTCACA 120
121 TTTCCCCTCCCCTGCAAATCTCATCCCTTAACAAAGGAGAGGGAAAGGCTGAGGGCAACAG 180
181 AAATGTGGGGCCTGTAGCCTGGGGATGGGAACGNNGGTGCCGTGTGGCATTGGCAGGCA 240
241 GTGCCTGGGAGGCAGGCTTGGCATCNCCCTCTCTGGGTGGGGCTGGTTGTGGCCTGACC 300
301 GTGTCCACGCTCCCTGCAGTGAGTTCATAGAGTTGGCCTTGATGGCTTCTAGTGACAGT 360
361 TCCGCCTTCAACAGGAGCTCTGCCACGATGCCTGTGTAGTGTGAGGGCGGTTGAAGGCC 420
421 AGTTCCCTGGTAGATTTTCTGGATACAGTTGTACCTGTCCAGGGAGCAGGGGACAGCCCT 480
481 CAGATCTTGGTGTGGGAAACATCCTTTCAGTGTCTCCTCCTCCTGCCAGACTGCCCCGACA 540
541 CCCAAATCTCCCTGCTCTCATCCCAAATTTCTCCGGATCAGCCCAGCCCAGCCCCAGCCTC 600
601 GCACCAATCTCCCTGGCAGGAAGGCAGGAATCCCCGACCCCTCCCTGTGGCCTCCATTC 660
661 CCCACTGGGTGGTGGAGAGGGAGAAATTTGGGCCCACTGGTGTCCCTTCCCATAGCACT 720
721 CCCCAGGCTCCCTGACCCTACCGTACTGGAAGATGCAGTCCCAGGCCTCAAAGTGTCTCCT 780
781 CCACACCTCGGGGCTGATCCAGCGAGACAGGCTCCTGGGCATGAACATGAGCTGGACGGT 840
841 GGATTTGAACATGACCTCCAGGGCATGGANGAAGTTC 877

```

Tab. 2 Sequenzen der klonierten Inserts (s. 3.4.).