

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen
Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Pseudohypoaldosteronismus
Typ I:
Auswirkungen unterschiedlicher Genotypen auf den
Blutdruck

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

vorgelegt von
Julia Kathrin Jückstock
aus München
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
Der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. Schmidt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. König

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. H. Schmidt

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2007

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG.....	4
II. THEORETISCHER TEIL.....	6
1. MOLEKULARE GRUNDLAGEN ANGEBORENER BLUTDRUCKSTÖRUNGEN.....	6
1.1 Genetische Forschung.....	6
1.2 Hypothesen zur Genese der essentiellen Hypertonie.....	8
1.2.1 Alterungsprozesse in Gefäßen.....	8
1.2.2 Hypertonie-assoziierte Polymorphismen und Mutationen.....	10
1.3 Adrenal bedingte Hypertonien.....	11
1.3.1 Phäochromozytom.....	11
1.3.2 Morbus Cushing.....	11
1.3.3 Primärer Hyperaldosteronismus (Conn-Syndrom).....	11
1.4 Den Mendel'schen Vererbungsgesetzen folgende Hypertonien.....	12
1.4.1 Mutationen, die zirkulierende Mineralocorticoide betreffen.....	12
1.4.2 Mutation, die den Mineralocorticoid-Rezeptor betrifft.....	13
1.4.3 Mutation, die Ionenkanäle der Niere betrifft.....	14
1.4.4 Veränderungen im NaCl-Cotransporter.....	14
1.4.5 Hypertonie mit Brachydaktylie.....	14
1.5 Den Mendel'schen Vererbungsgesetzen folgende Störungen, die zu Hypotonie führen.....	15
1.5.1 Aldosteron- und Cortisolsynthesedefekte.....	15
1.5.2 Gitelman- und Bartter-Syndrom.....	15
1.5.3 Pseudohypoaldosteronismus Typ I.....	16
1.6 Ergebnisse aus Tierversuchen.....	17
1.6.1 Hypertoniegene auf dem Y-Chromosom bei Ratten.....	17
1.6.2 Spannungsabhängige Kaliumkanäle in Gefäßmuskelzellen.....	18
1.7 Frühe Veränderungen der Nierenfunktion.....	18
2. GRUNDZÜGE DER BLUTDRUCKREGULATION IN DER NIERE.....	19
2.1 Allgemeine Parameter: Elektrolyt- und Wasserhaushalt.....	19
2.1.1 Regulierung der Wasser- und Kochsalzhomöostase.....	19
2.1.2 Natrium-Transport in der Niere.....	20
2.1.3 Epitheliale Regulierung des Zellvolumens.....	22
2.2 Hormonelle Parameter: Überblick über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....	24
2.2.1 Allgemeines.....	24
2.2.2 Regulierung des RAAS.....	25
2.3 Aufbau des Mineralocorticoid-Rezeptors.....	27
2.4 Aufbau des Amilorid-sensitiven epithelialen Natriumkanals (ENaC).....	30
2.4.1 Äußeres Erscheinungsbild und Verteilungsmuster im Gewebe.....	30
2.4.2 Molekularer Aufbau des epithelialen Natriumkanals.....	33
2.4.3 Biophysiological Funktion von ENaC.....	37
2.4.4 Inhibierbarkeit durch Amilorid.....	39
2.4.5 Regulationsmechanismen von ENaC.....	40

2.5	Aufbau der α -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals.....	47
	(α ENaC)	47
2.5.1	Struktureller Aufbau und Lokalisation des α ENaC-Gens	47
2.5.2	Intronsequenzen der α -Untereinheit.....	47
2.5.3	Genomische Organisation der α -Untereinheit.....	48
2.5.4	Struktur der 5'-Flankiersequenz	48
2.5.5	Polymorphismen in der α -Untereinheit des ENaC	49
3.	DAS KRANKHEITSBILD DES PSEUDOHYPOALDOSTERONISMUS	52
3.1	Pseudohypoaldosteronismus Typ I	52
3.1.1	Definition	52
3.1.2	Vererbungsmodus.....	52
3.1.3	Klinisches Erscheinungsbild.....	57
3.1.4	Pathogenese	59
3.1.5	Diagnosestellung.....	60
3.1.6	Therapie	63
3.1.7	Verlauf.....	64
3.2	Pseudohypoaldosteronismus Typ II	65
3.3	Pseudohypoaldosteronismus Typ III (Transienter Pseudohypoaldosteronismus).....	66
4.	KRANKENGESCHICHTE DER INDEXPATIENTEN.....	66
4.1	Fallbeschreibung, Therapie und Verlauf beim Mädchen, (M.P.).....	67
4.2	Fallbeschreibung, Therapie und Verlauf beim Jungen, (B.P.)	68
4.3	Genaue Lokalisation der Genveränderung bei den Indexpatienten.....	69
III.	EXPERIMENTELLER TEIL	71
5.	BESCHREIBUNG DER VERWENDETEN TECHNIKEN UND MATERIALIEN	71
5.1	Grundzüge der PCR (Polymerase Chain Reaction)	71
5.1.1	Prinzip der PCR	71
5.1.2	Ermittlung der richtigen Reaktionstemperatur.....	72
5.1.3	Analyse der PCR-Produkte	73
5.2	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)	74
5.3	Grundzüge der DNA-Sequenzierung	75
5.3.1	Beschreibung der unterschiedlichen Methoden	75
5.3.2	Sequenzierung von PCR-Produkten	77
5.3.3	Zyklische Sequenzierung	78
5.3.4	Automatische Sequenzierung	78
6.	BESCHREIBUNG DER EIGENEN VERSUCHE	80
6.1	Untersuchte Personen	80
6.2	Untersuchungsmethoden.....	80
6.2.1	Allgemeines.....	80
6.2.2	Klinische Untersuchungen	81
6.2.3	Laborchemische Befunde	81
6.2.4	Molekulargenetische Untersuchungen.....	81
6.2.5	Statistische Auswertung.....	82
6.3	Durchführungsprotokoll der Experimente	83
6.3.1	Verwendete Substrate.....	83
6.3.2	DNA-Isolierung.....	84

6.3.3	DNA-Vervielfältigung.....	84
6.3.4	Analyse der PCR-Produkte.....	85
6.3.5	Produktreinigung.....	86
6.3.6	Sequenzier-PCR und Entfärbung der Produkte.....	86
6.3.7	Sanger-Sequenzierung.....	86
7.	ERGEBNISSE.....	87
7.1	Klinische Untersuchungen.....	87
7.2	Laborchemische Befunde.....	90
7.2.1	Analyse des EDTA-Blutes.....	91
7.2.2	Analyse des Blutserums.....	92
7.2.3	Analyse des 24h-Sammelurins.....	93
7.3	Molekulargenetische Untersuchungen.....	95
IV. DISKUSSION.....		99
V. ZUSAMMENFASSUNG.....		106
VI. VERWENDETE LITERATUR.....		108
VII. DANKSAGUNG.....		115
VIII. ANHANG.....		116
1.	GRAFIKEN.....	116
2.	TABELLEN.....	122
3.	LEBENS LAUF.....	127

I. EINLEITUNG

Arterielle Hypertonie und ihre Folgekrankheiten betreffen in der westlichen Welt rund 20% der Erwachsenen und stellen hier noch immer die häufigste Todesursache dar, ohne dass ihre Ursachen bisher vollständig geklärt werden konnten.

In über 90% aller Hypertoniefälle handelt es sich um die sogenannte **essentielle Hypertonie** unbekannter Ätiologie [31]. Allerdings wurden mittlerweile viele Risikofaktoren, (z.B. Nikotinabusus, Adipositas, Hypercholesterinämie etc.), identifiziert, die zu einer pathologischen Erhöhung des Blutdruckes führen können. Außerdem wurden bereits viele Erkenntnisse in der kurzfristigen Blutdruckregulation, (z.B. der Orthostase-Reaktion), gewonnen, während die genauen Mechanismen der Langzeitregulation noch nicht ausreichend erforscht sind.

Um aber Diagnostik und Therapie in nächster Zeit verbessern zu können, ist es notwendig, genauere Erklärungen für die Pathogenese von Hypertonien zu erlangen.

Auch bei der arteriellen Hypotonie wird zwischen einer essentiellen, meist harmlosen, und einer sekundären Form unterschieden.

Die erworbene Art der Hypotonie wird unter anderem durch Krankheiten, wie z.B. das Adrenogenitale Syndrom (AGS) oder den Pseudohypoaldosteronismus Typ I verursacht, der zu schwerer bis schwerster arterieller Hypotonie führen kann.

Anhand von experimentellen und klinischen Studien, Aufklärung von nach den Mendel'schen Gesetzen vererbten Blutdruck-Regulationsstörungen und unterschiedlichsten Tierversuchen bzw. Experimenten an speziell gezüchteten Zellen, (z.B. A6-Zellen des Amphibien-Organismus *Xenopus laevis*), ist es inzwischen gelungen, einzelne Gene, die für die Entstehung von Hyper- oder Hypotonie verantwortlich sind, zu identifizieren.

Als gesichert gilt, dass die Chromosomen 2 und 17 eine entscheidende Rolle spielen [65].

Da aber die verschiedenen Studien bezüglich spezieller mit der Regulierung des Blutdrucks assoziierter Gene häufig kontroverse Ergebnisse liefern, hat sich mittlerweile die Theorie der multifaktoriellen Vererbung durchgesetzt, d.h. es gibt

mehrere Faktoren, die einzeln nicht krankheitsauslösend sind, sondern erst in ihrer Zusammenwirkung eine klinisch identifizierbare Störung zur Folge haben.

Dabei fand man unterschiedliche Mutationen, die deutliche Effekte mit daraus resultierenden mehr oder weniger ausgeprägten Krankheitsbildern hervorrufen, und solche, die nur einen geringen Einfluss auf das Blutdruckverhalten haben.

Weiterhin zeigte sich, dass in allen Fällen von Hypertonie, bei denen die Nierenfunktion untersucht wurde, eine Störung der renalen Salzbalance vorlag [78]. Absolut notwendig für die Aufrechterhaltung der Salzhomöostase des Körpers ist die regelrechte Funktion des epithelialen Natriumkanals (ENaC), der unter anderem auch in der Niere vorhanden ist. Sowohl eine Aktivitätszunahme als auch eine Funktionsminderung bzw. ein Funktionsverlust des Kanals führt zu schwerwiegenden Krankheitsbildern (Liddle-Syndrom, oder Pseudohypoaldosteronismus Typ I). Diese Syndrome haben nicht nur eine Änderung des Natrium-Metabolismus zur Folge, sondern auch pathologische Alterationen des Blutdrucks.

Dem sehr seltenen Krankheitsbild des Pseudohypoaldosteronismus Typ I liegen unterschiedliche Mutationen des Gens für den epithelialen Natriumkanal (SCNN1-Gen) zu Grunde.

Die Krankheit kann autosomal dominant oder autosomal rezessiv vererbt werden; bei der rezessiv vererbten Form wird die entsprechende Genmutation über heterozygote Genträger an die Nachkommen weitergegeben.

Hinsichtlich dieser Mutationen gibt es bereits eine Reihe genetischer Untersuchungen von Pseudohypoaldosteronismus-Patienten, aber nur sehr wenige DNA-Analysen von den Verwandten dieser Personen.

Ziel unserer Untersuchungen war es, zu bestimmen, wie groß der Einfluss einer heterozygot vorliegenden Mutation des SCNN1A-Gens auf den Blutdruck ist. Unter der Hypothese, dass eine Genmutation, die in homozygoter Ausprägung zu schwerer bis schwerster Hypotonie führen kann, eventuell ebenfalls Auswirkungen auf den Blutdruck hat, wenn sie in heterozygoter Form vorliegt, untersuchten wir 8 Mitglieder einer Familie, in der zwei Fälle von Pseudohypoaldosteronismus aufgetreten sind.

II. THEORETISCHER TEIL

1. Molekulare Grundlagen angeborener Blutdruckstörungen

1.1 Genetische Forschung

Man geht davon aus, dass der Blutdruck zu etwa 30-50% durch genetische Faktoren beeinflusst wird: Verschiedene Studien haben gezeigt, dass sowohl der systolische als auch der diastolische Blutdruckwert bei Zwillingen sehr stark korreliert, bei Verwandten ersten Grades nur noch mäßig, und bei Adoptivkindern und ihren Eltern kein Zusammenhang mehr festgestellt werden kann [43].

Das ließ den Schluss zu, dass genetische Parameter einen weit größeren Einfluss auf die Blutdruckregulation haben als Umweltfaktoren.

Kotanko und seine Mitarbeiter hatten 1997 entdeckt, dass Schwarzafrikaner eine gegenüber Weißen signifikant erhöhte Salzsensitivität zeigen, (d.h. unter anderem eine Zunahme des Blutvolumens bei vermehrtem Salzangebot) [73]. In

Zwillingsstudien konnte eine größere Konkordanz für Salzsensitivität zwischen eineiigen Zwillingen als zwischen Zweieiigen nachgewiesen werden, was die Hypothese der genetisch bedingten Blutdruckregulation ebenfalls unterstützt [43].

Ein weiteres Ergebnis von Familienstudien war, dass das relative Risiko, eine Hypertonie zu entwickeln um so größer war, je mehr hypertone Verwandte eine Person hat, und je jünger diese Verwandten zur Zeit der Diagnosestellung waren [95].

Deshalb suchte man in den letzten Jahren verstärkt nach Genvarianten und ihren Auswirkungen auf molekularer Ebene. Dabei konnten einige der Hypertonie zu Grunde liegende Gene identifiziert und lokalisiert werden. So sind z.B. das Kallikrein-Gen, das ACE-Gen und das für das Hormon Renin codierende Gen in Zusammenhang mit erhöhtem Blutdruck gebracht worden [85].

Außerdem konnte bereits eine Reihe von erblichen Krankheiten identifiziert werden, bei denen Hyper- oder auch Hypotonie auftritt, (s. unten).

Im Laufe der Entstehung einer klinisch manifesten Hypertonie treten sogenannte **Intermediär-Phänotypen** auf, die entweder nur diskret veränderte Werte oder Organveränderungen, (z.B. an der Niere), aufweisen, die bisher nicht mit hohen Blutdruckwerten in Verbindung gebracht oder lediglich als eine Folgeerscheinung davon interpretiert wurden.

Interessanterweise zeigen diese Intermediär-Phänotypen eine viel größere Vererblichkeit als die Hypertonie an sich.

Obwohl man nicht vom Phänotyp auf das zu Grunde liegende Gen schließen kann, eignen sich Personen, die Merkmale der Hypertonie-Vorformen tragen, dennoch gut für die Durchführung von Studien, wenn man sie auf Übereinstimmungen in bestimmten Genombereichen screent.

So fand man bei 11 Untersuchungen in 9 Ländern heraus, dass spezielle HLA-Antigene, (HLA-B12, B15, B18), bei Hypertensiven öfter exprimiert werden als bei Normotensiven [156].

Außerdem war das N-Allel der MN-Blutgruppen häufiger bei Hypertonikern vorhanden, und es scheint bestimmte Polymorphismen des Haptoglobin-Locus zu geben, die mit erhöhten Blutdruckwerten assoziiert werden [156].

Für die Dyslipidämie-Hypertonie, die mit pathologisch veränderten Blutfetten vergesellschaftet ist, konnten bereits zwei verantwortliche Mutationen (S447X und Hind III) identifiziert werden [119]: Wenn das Enzym Lipoproteinlipase nicht korrekt ausgebildet wird, kommt es zu einer Erhöhung der Triglyzeride bei gleichzeitigem Abfall der HDL-Konzentrationen und in der Folge zur Hypertonie [156].

Als Beispiel für die Interaktion genetischer Faktoren mit Umweltkomponenten kann man Personen nennen, die das Gen für schwere Adipositas besitzen, das mit hohen Insulinspiegeln assoziiert ist. Es zeigte sich nämlich, dass erhöhte Nüchtern-Insulinwerte eine gesteigerte Salzsensitivität hervorrufen [124], wodurch eine vermehrte Natrium-Retention und als Folge Hypertonie begünstigt werden [8]. Bei diesen Menschen kann der Blutdruck gesenkt werden, wenn sie im täglichen Leben drei Maßregeln einhalten:

1. eine strenge Natriumbeschränkung, um die Salzretention in der Niere bzw. im Körper zu verhindern,
2. regelmäßige körperliche Anstrengung, um die Insulinspiegel zu senken und

3. das Einhalten einer Diät, um das Körpergewicht zu reduzieren und ebenfalls die Insulinwerte zu senken.

Damit ließe sich eine Senkung des Blutdruckes um ungefähr 10 mmHg erreichen.

Neben diesen multigenen Ansätzen, die Ursachen der primären Hypertonie zu erklären, sind aber bereits einige bestimmte Gene bekannt, die einen sehr großen Einfluss auf den Blutdruck haben und bei denen sich Mutationen in speziellen, klar abgrenzbaren Krankheitsbildern manifestieren, (s. unten).

1.2 Hypothesen zur Genese der essentiellen Hypertonie

1.2.1 Alterungsprozesse in Gefäßen

Ein Ansatzpunkt, die Entstehung von Hypertonie zu erklären, ist das Altern von Gewebe und zwar vor allem die Versteifung von arteriellen Gefäßen und den dadurch ansteigenden Pulsdruck. Man hat herausgefunden, dass der arterielle systolische Blutdruck mit zunehmendem Alter bei Menschen in Industrieländern ansteigt, während der diastolische Wert annähernd gleich bleibt oder sogar absinkt, was durch den Alterungsprozess der arteriellen Gefäße bedingt wird [8].

Dabei gibt es zum Teil deutliche Unterschiede zwischen dem chronologischen, also dem tatsächlichen, und dem sogenannten biologischen Alter, wobei verschiedene Interaktionen von Genen eine Rolle spielen: Wechselwirkungen der Gene untereinander, mit ihren Genprodukten und/oder mit der Umwelt.

Gemäß einer anderen Hypothese kann sich eine Hypertonie ausbilden, wenn das biologische Alter das chronologische übersteigt, also bei „vorgealterten“ Personen [8].

Die Hypothese des fetalen Ursprungs der Hypertonie wurde aufgestellt, als in einer Studie von Barker [12, 13] gezeigt wurde, dass ein niedriges Geburtsgewicht ein Risiko darstellt, im Lauf des weiteren Lebens eine Hypertonie und koronare Herzerkrankung zu entwickeln.

Interessant dabei ist, dass nicht Kinder, die zu früh geboren werden, davon betroffen sind, sondern solche, die bei der Geburt zu leicht sind.

Barker folgerte daraus einen Zusammenhang zwischen den anthropometrischen Parametern bei der Geburt und dem Blutdruck im Kindheits- und Erwachsenenalter [8].

A. Aviv sieht die Ursache der Hypertonie in diesem Fall darin begründet, dass intrauterine Wachstumsretardierung zum frühzeitigen Altern der arteriellen Gefäße führt [8].

Allerdings ist diese Hypothese noch nicht vollständig überprüft worden.

Die ursprünglich von Williams formulierte Theorie der antagonistischen Pleiotropie [156] befasst sich mit der Frage, inwieweit die Lebensweise in der reproduktiven Phase, (also in etwa dem Alter zwischen 18 und 42 Jahren), die „Fitness“ in der postreproduktiven, und vor allem postmenopausalen Lebensphase, beeinflusst. Es zeigte sich, dass Frauen, die wenige Kinder und diese sehr spät geboren haben, eine gegenüber der Normalbevölkerung erhöhte Lebenserwartung aufweisen [156]. Daraus lässt sich schließen, dass frühe Reproduktion mit beschleunigtem (zellulären) Altern und damit einem erhöhten Risiko, eine Hypertonie zu entwickeln, verbunden ist.

Ein sehr sensibler Indikator für biologische Zellalterung ist die Länge der sogenannten Telomere: Das sind bestimmte Basensequenzen am Ende jedes Gens, deren Länge bei jeder Zellteilung ein Stück abnimmt. Sie sind bei allen Menschen unterschiedlich lang, (wobei Frauen längere Telomere besitzen als Männer), stark erblich und umgekehrt proportional zum chronologischen Alter und dem Pulsdruck der Person, also der Abstand zwischen dem systolischen und dem diastolischen Blutdruckwert, der die Druckwelle beschreibt, die mit jedem Herzschlag durch das Blutgefäßsystem läuft.

Harley et al. formulierte 1992 die Hypothese der Telomerlängenverkürzung, d.h. dass die biologische Zellalterung eine Folge von kumulierten Gen-Schädigungen durch Sauerstoffradikale ist, die den Abbau der Telomere steigern und damit die Zahl der im Laufe des Lebens möglichen Replikationszyklen senken, was zu vorzeitigem Altern führt [60].

Man kann also schließen, dass nicht nur sogenannte **Hypertoniegene** an der Entstehung von hohem Blutdruck beteiligt sind, sondern auch solche, die für biologische Alterungsprozesse verantwortlich sind.

1.2.2 Hypertonie-assoziierte Polymorphismen und Mutationen

Auch Genvariationen im β 2- Adrenergen Rezeptor (B2AR) können mit der Entwicklung einer Hypertonie assoziiert sein [15].

Bisher sind drei Polymorphismen im B2AR-Gen bekannt, das auf Chromosom 5, (5q31-32), lokalisiert ist:

1. die Codierung für die Aminosäurefolge Arg16Gly,
2. Gln27Glu und
3. 5'LC-Arg19Cys, die wahrscheinlich alle eine Rolle bei der Entstehung von Asthma bronchiale, Adipositas und Hypertonie spielen [122]; [103].

Das Gly16-Allel führt bei Schwarzen der Karibik zu erhöhten Blutdruckwerten und war in einer Studie an männlichen normotensiven Österreichern für eine verminderte Vasodilatation bei gleichzeitiger Ausbildung eines Hypertonus nach Salbutamolinfusion verantwortlich [57]; 73].

Andererseits lag bei untersuchten ebenfalls hypertonen Norwegern und Deutschen die andere Variante, nämlich das Arg16-Allel, vor [147];[22].

5'LC codiert für ein Polypeptid, das die Expression der β 2- Adrenergen Rezeptoren beeinflusst, wodurch das Risiko der Betroffenen für die Entwicklung einer Hypertonie und eines Typ2-Diabetes ansteigt.

Es zeigte sich ebenfalls, dass dieses Allel zusammen mit der Gln27Gln-Variante für eine Verschlechterung der Blutdruckwerte bei bereits bestehender Hypertonie verantwortlich gemacht werden kann [15].

Außerdem wurde bei einer Untersuchung an diskordanten Geschwisterpaaren festgestellt, dass der Haplotyp LC-Cys19-Arg16-Gln27 ein erhöhtes Risiko für eine Verschlechterung der Blutdruckwerte bei bestehender Hypertonie darstellt und mit höheren systolischen Drucken einhergeht [15].

1.3 Adrenal bedingte Hypertonien

Einer Reihe von Hypertonien liegt eine Fehlfunktion der Nebenniere zugrunde:

1.3.1 Phäochromozytom

Diese Störung, die von den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks ausgeht, äußert sich in krisenhaftem Hypertonus, Tachykardien und erhöhter Schweißsekretion, kann aber auch symptomlos verlaufen und nur durch einen Zufallsbefund entdeckt werden.

Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem zwanzigsten und fünfzigsten Lebensjahr, wobei Männer und Frauen gleich oft betroffen sind.

Komplikationen sind Apoplexie, Lungenödem und Myokardinfarkt, was den Folgen einer unbehandelten schweren Hypertonie entspricht.

1.3.2 Morbus Cushing

Diese Störung geht mit einer pathologisch erhöhten Cortisolwirkung einher, wobei die Ursachen sehr vielfältig sein können: So kommen autonom Cortisol produzierende Tumoren der Nebennierenrinde (Adenome oder Karzinome) mit verminderter CRF- und ACTH-Sekretion, die autonom Cortisol produzierende Nebennierenrindenhyperplasie, Hypophysenadenome, eine hypothalamische Mehrsekretion von CRF und paraneoplastische Syndrome in Betracht.

Als Symptome treten unter anderem Vollmondgesicht und Stammfettsucht neben Hypertonie und einer diabetischen Stoffwechsellage auf.

Die Komplikationen sind dieselben der unbehandelten Hypertonie und des Diabetes mellitus.

1.3.3 Primärer Hyperaldosteronismus (Conn-Syndrom)

Definiert ist dieses Krankheitsbild durch eine primäre unangemessene Aldosteron-Mehrsekretion mit konsekutiver Suppression der Reninsekretion.

Die Ursache liegt zu 70% in einem Nebennierenrinden-Adenom begründet; Karzinome sind sehr selten.

Die Patienten zeigen als Symptome vor allem Hypertonie und Hypokaliämie, Proteinurie und Muskelschwäche; die Komplikationen entsprechen denen der unbehandelten Hypertonie und Hypokaliämie.

1.4 Den Mendel'schen Vererbungsgesetzen folgende Hypertonien

Einige Krankheiten sind mit einer Fehlregulation des Blutdruckes assoziiert und werden nach den Mendel'schen Gesetzen vererbt.

In Studien zeigte sich, dass diesen Krankheitsbildern immer eine Störung der renalen Salzbalance, (s. Kapitel 2.1.1), zu Grunde liegt [78].

Dies kann zum einen auf einer Über- oder Unterproduktion von verschiedenen die Salzexkretion regulierenden Hormonen beruhen, oder auf Defekte in zugehörigen Rezeptoren und Ionenkanälen zurückzuführen sein.

Dabei ist interessant, dass die klinische Ausprägung nicht nur bei den einzelnen Störungen ganz unterschiedlich sein kann, sondern auch eine deutliche intraindividuelle Varianz zeigt.

Vermutet wird das Zusammenspiel verschiedener Gene, ohne genau sagen zu können, welche und wie viele das im Einzelnen sind.

Im Folgenden sollen einige dieser Genmutationen, die eindeutig einer bestimmten Blutdruckstörung zuzuordnen sind, vorgestellt und erläutert werden:

1.4.1 Mutationen, die zirkulierende Mineralocorticoide betreffen

Hierzu zählt man u.a. den **Glucocorticoid sensiblen Aldosteronismus (GSA)**.

Diese Krankheit wird autosomal dominant vererbt und äußert sich in früher Hypertonie und Hypokaliämie bei normalen oder erhöhten Aldosteronspiegeln und erniedrigter Plasmareninaktivität.

Das der Störung zu Grunde liegende Gen (CYP11B1/2) codiert für das Enzym Aldosteronsynthase, welches bei Gesunden vom Renin-Angiotensin-System reguliert wird, (s. Kapitel 2.2), bei Patienten mit GSA aber unter der Kontrolle von ACTH steht.

Daher ist auch erklärbar, warum sowohl die Aldosteronsekretion, als auch die Hypertonie durch Gabe von exogenen Glucocorticoiden komplett supprimiert werden kann, da diese infolge der negativen Rückkopplung zwischen Nebenniere und Hypophyse die ACTH-Sekretion unterdrücken [94].

Eine weitere Krankheit dieser Art ist der **scheinbare Mineralocorticoid Exzess** [103]. Autosomal rezessiv vererbt, führt diese Störung früh zu Hypertonie, metabolischer Alkalose und Hypokaliämie bei gleichzeitig verminderter Reninaktivität.

Außerdem sind die Serumaldosteronspiegel scheinbar stark erniedrigt bis gar nicht messbar.

Der Defekt auf molekularer Ebene betrifft das 11 β HSD2-Gen, das für die Synthese der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase verantwortlich ist.

Durch die Mutation wird das Enzym, das die Umwandlung von Cortison in die inaktive Form (Cortisol) bewirkt, funktionslos.

Cortison ist in der Lage, den Mineralocorticoidrezeptor (MR) zu aktivieren und damit zu erhöhtem Blutdruck zu führen.

Als wirksame Therapiemöglichkeit stehen Aldosteronantagonisten wie Spironolacton zur Verfügung, da sie den Rezeptor blockieren und so die Symptome mildern [94].

1.4.2 Mutation, die den Mineralocorticoid-Rezeptor betrifft

Genetisch bedingte Schwangerschaftshypertonie, die eine autosomal dominant vererbte Variation des Mineralocorticoidrezeptors darstellt, (MR S810L), bewirkt eine gesteigerte Sensitivität des Rezeptors gegenüber anderen Corticoiden, wie z.B.

Progesteron, das in der Schwangerschaft vermehrt synthetisiert und sezerniert wird.

Durch Aktivitätszunahme des MR kommt es zur Hypertonie, die zu lebensbedrohlichen Krisen (Eklampsie) für Mutter und Kind führen kann [94].

Die Störung liegt auf dem MR-Gen auf Chromosom 4, (s. Kapitel 2.3).

1.4.3 Mutation, die Ionenkanäle der Niere betrifft

Das autosomal dominant vererbte Liddle-Syndrom geht mit Hypertonie, Hypokaliämie, metabolischer Alkalose und erniedrigter Renin- und Aldosteronaktivität einher.

Es ist sozusagen das Gegenbild des Pseudohyperaldosteronismus Typ I, der weiter unten genauer erläutert wird, (s. Kapitel 3.1).

Die Krankheit beruht auf einer Mutation in der β - oder der γ -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals (ENaC), wobei der zytoplasmatische COOH-Terminus verlorengeht. Dadurch steigt die Aktivität des Kanals an, was zu erhöhtem Blutdruck führt.

Interessant ist, dass gleichzeitig die Zahl der auf der Zelloberfläche exprimierten Kanäle ansteigt, da ihre biologische Halbwertszeit verlängert ist.

Als Therapie eignen sich Triamteren und eine salzarme Diät.

1.4.4 Veränderungen im NaCl-Cotransporter

Die meisten bekannten Fälle des Pseudohypoaldosteronismus Typ II (Gordon-Syndrom) weisen einen autosomal dominanten Erbgang auf, wobei die der Störung zu Grunde liegenden Mutationen im WNK-4-Gen und im ersten Intron des WNK-1-Gens liegen [157]. Allerdings geht man davon aus, dass mindestens drei verschiedene Gene beteiligt sein müssen, die auf den Chromosomen 1, 12 und 17 lokalisiert sind [99]; [35].

Als Symptome treten Hypertonie, Hyperkaliämie und eine metabolische Azidose bei normalen Renin- und Aldosteronwerten auf.

Außerdem wird vermehrt Chlorid resorbiert, was aber durch Hydrochlorothiazid korrigiert werden kann.

1.4.5 Hypertonie mit Brachydaktylie

Diese Störung äußert sich in schwerer früh auftretender Hypertonie in Verbindung mit Skelettfehlbildungen an Händen und Handgelenken. Die verantwortliche Genveränderung konnte auf dem Chromosom 12 in den Genen PDE3, Kir6.1 und im Gen für den Sulfonylharnstoff-Rezeptor 2 lokalisiert werden [96]; [10].

1.5 Den Mendel'schen Vererbungsgesetzen folgende Störungen, die zu Hypotonie führen

1.5.1 Aldosteron- und Cortisolsynthesedefekte

Diese Krankheitsbilder betreffen die Funktion der Nebennierenrinde als Ganzes; isolierte Aldosteronsynthesedefekte sind selten und durch Veränderungen der Enzyme gekennzeichnet, die für die letzten Schritte der Aldosteronbildung notwendig sind.

Hierzu gehört die autosomal rezessiv vererbte Funktionsstörung der Aldosteronsynthese, der eine Mutation im CYP11B2-Gen zu Grunde liegt.

Angeborene Nebennierenhypoplasie, (X-chromosomal oder autosomal dominant vererbt), aber auch Nebennierenhyperplasie, (autosomal rezessiv), verursachen Krankheiten, die neben den vielfältigen Symptomen, die durch das fehlende Cortisol hervorgerufen werden, auch durch erniedrigten Blutdruck gekennzeichnet sind.

Durch Aldosteronantagonisten, die in diesem Fall vermehrt synthetisiert werden, kommt es zu einer Verstärkung des Salzverlustes und der daraus resultierenden Krankheitserscheinungen.

Im Fall der **Hypoplasie** sind die funktionslosen Enzyme das DAX-1-Protein und das SF-1, während bei der **Hyperplasie** die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ2 und die 21-Hydroxylase betroffen sind.

1.5.2 Gitelman- und Bartter-Syndrom

Hierbei handelt es sich um Defekte von Ionenkanälen, die nicht vom RAAS kontrolliert werden.

Autosomal rezessiv vererbt, treten bei diesen Krankheiten Hypokaliämie und metabolische Alkalose auf. Der Blutdruck ist häufig normal, trotz extrem erhöhter Renin- und Aldosteronwerte.

Interessant dabei ist die sehr unterschiedliche klinische Ausprägung:

Manche Patienten erleiden in der neonatalen Periode lebensbedrohliche Krisen, während bei anderen die Störung durch einen Zufallsbefund entdeckt wird.

Mittlerweile hat man zwei verschiedene Gene identifiziert, die an der Entstehung der Krankheit beteiligt sind und zu renalem Salzverlust führen [134];[18]:

1. SLC12A3 im distalen Tubulus der Niere und
2. CLCNKB, das entweder bei komplettem homozygotem Genverlust oder durch eine A → G-Mutation im Intron 7 zum Krankheitsbild des Gitelman-Syndroms führt [139].

Beim Gitelman-Syndrom ist der Thiazid-sensitive NaCl-Cotransporter im distalen Sammelrohr der Niere betroffen, was unter anderem neuromuskuläre Symptome auslöst.

Das Bartter-Syndrom, von welchem wiederum zwei verschiedene Phänotypen bekannt sind (pränatales und sogenanntes **klassisches** Bartter-Syndrom), beruht auf Veränderungen des NaK₂Cl-Cotransporters, des ATP-sensitiven K⁺-Kanals oder des basolateralen Cl⁻-Kanals und unterscheidet sich vom Gitelman-Syndrom durch Hyperkalziurie und normalem bis leicht erniedrigtem Magnesiumspiegel [86].

1.5.3 Pseudohypoaldosteronismus Typ I

Man kann bei dieser Krankheit zwei Formen unterscheiden:

Eine leichte autosomal dominant vererbte und eine schwere Form, die autosomal rezessiv vererbt wird.

Die zugehörigen Mutationen befinden sich in den SCNN1-Genen auf den Chromosomen 16p12.2 – 13.11 und 12p13.1 – pter, wobei jeweils immer nur ein Chromosom betroffen ist.

Man hat herausgefunden, dass diese Genvarianten in einer Verkürzung des COOH-Endes des Amilorid-sensitiven epithelialen Natriumkanals (ENaC) resultieren, was sich in einer Resistenz der Endorgane gegenüber Mineralocorticoiden bemerkbar macht, (s. Kapitel 3.1).

Dabei ist der Mineralocorticoidrezeptor der Endorgane selbst nicht betroffen, wie lange Zeit vermutet wurde.

Symptome sind Hyponatriämie und Hyperkaliämie und schwere bis schwerste Hypotonie trotz extrem erhöhter Aldosteron- und Reninwerte.

Während die dominante Form sich hauptsächlich auf die renalen ENaC-Kanäle auswirkt, hat die rezessive Variante Funktionsverluste in allen

aldosteronabhängigen Organen zur Folge, was den schweren systemischen Verlauf erklärt.

Außerdem spielt bei der rezessiv vererbten Form Kosanguinität (Blutsverwandtschaft) in der Familie eine große Rolle.

Hier tritt im Unterschied zur dominanten Form keine Besserung mit zunehmendem Lebensalter ein.

Da die Ursache der Störung nicht auf einem Aldosteronmangel, sondern darauf beruht, dass das Hormon seine Wirkung nicht entfalten kann, ist es nicht möglich, den Salzverlust durch Mineralocorticoide zu verhindern, weshalb die Therapie hauptsächlich auf die Substitution von Kochsalz beschränkt ist [75].

1.6 Ergebnisse aus Tierversuchen

1.6.1 Hypertoniegene auf dem Y-Chromosom bei Ratten

Einige an der Blutdruckregulation beteiligte Gene sind auf Chromosom 7q beim Menschen, (bzw. Chromosom 4 bei Ratten), zum Teil aber auch auf dem Y-Chromosom lokalisiert.

Eine Sequenzvariation dieser Gene hat Blutdruckstörungen zur Folge, wie Ely und Turner in einer Studie an Ratten zeigen konnten [39]:

Dabei wurden spontan hypertensive Ratten (SHR) und normotensive Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) miteinander verglichen.

Es zeigte sich, dass die Blutdruckwerte der SHR sanken, wenn ihnen das Y-Chromosom der WKY übertragen wurde, und dass umgekehrt die WKY unter dem Einfluss des SHR-Y-Chromosoms eine Hypertonie ausbildeten.

Allerdings ist man sich nicht sicher, ob die Ergebnisse nur speziell für diese Ratten gelten, oder eine allgemeine Gültigkeit besitzen.

Vladimir Kren et al. [74] führten eine weitere Studie durch, die zeigte, dass die auf dem Y-Chromosom gelegenen und für die Höhe des Druckes verantwortlichen Gene mit ca. 20% zur Entwicklung einer Hypertonie bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) beitragen.

1.6.2 Spannungsabhängige Kaliumkanäle in Gefäßmuskelzellen

In den glatten Muskelzellen der Arterien sind spannungsgesteuerte Kaliumkanäle vorhanden, die durch das Kv1.X-Gen codiert werden. In Experimenten konnte eine Kontraktion dieser Gefäßmuskelzellen durch Blockade der Kanäle erzielt werden; gleichzeitig wurde festgestellt, dass die Leitfähigkeit der Kanäle bei hypertonen Zuständen abnimmt [33].

Yuan et al. konnten 1998 in einer Untersuchung zeigen, dass die Expression der Kv1.5-Untereinheit in der Pulmonalarterie bei Patienten mit primärer pulmonaler Hypertonie vermindert war [158], was die Entstehung der pulmonalen Hypertonie zum Teil erklären kann, allerdings noch keine weiteren Erkenntnisse zur Pathogenese der systemischen Hypertonie liefert.

1.7 Frühe Veränderungen der Nierenfunktion

Auf der Suche nach sich noch vor der eigentlichen Diagnosestellung der Hypertonie manifestierenden Veränderungen, machte man interessante Entdeckungen im Bereich der Nierenfunktion:

Es wurden Hypertoniker mit Aminosäure-Infusionen belastet, wobei sich zeigte, dass diese Probanden eine Verminderung ihrer renalen Funktionsreserven aufweisen, wodurch die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) unter Belastung nicht mehr optimal gesteigert werden kann.

Auch noch normotensive Personen, die ein hohes Risiko haben, eine Hypertonie zu entwickeln, hatten eine bereits initial erhöhte GFR, weshalb dann kein weiterer großer Anstieg mehr möglich war [111].

Dies wurde als ein frühes Hypertoniezeichen gedeutet und scheint an der Pathogenese des chronisch erhöhten Blutdruckes maßgeblich beteiligt zu sein. Das steht im Gegensatz zu bisherigen Vermutungen, dass die eingeschränkte funktionelle renale Kapazität, die sich durch basale Hyperfiltration und verminderte tubuläre Rückresorption unter Aminosäure-Belastung äußert, erst als eine Folgeerscheinung des Bluthochdrucks auftritt [111].

(RAAS) durch Modulation mittels natriuretischer Peptide und sympathischer Nierenerven reguliert wird, (s. Kapitel 2.2).

An der Konstanthaltung des Wasserhaushaltes sowie an der Regulierung der Wasserausscheidung sind im Wesentlichen folgende Faktoren beteiligt:

1. ADH

2. das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), (s. Kapitel 2.2)

3. der Perfusionsdruck der Blutgefäße

4. die Sympathikusaktivität und

5. natriuretische Peptide (z.B. ANP, BNP); sie zeigen zum Teil antagonistisches Verhalten zum RAAS: So bewirken sie neben einer Dursthemmung die Förderung der Natrium-Ausscheidung und in sehr hohen Dosen eine Relaxation der Gefäße.

2.1.2 Natrium-Transport in der Niere

Die Niere stellt neben dem für die Natrium-Regulierung wichtigsten System das maßgebliche Ausscheidungsorgan des Körpers für Wasser und Elektrolyte dar: Über sie werden jeden Tag ca. 150 mmol Natrium und 100 mmol Kalium und Chlorid umgesetzt [135].

Unter physiologischen Bedingungen ist die Niere in der Lage, die Urinosmolalität zwischen 50 und 1400 mosml/kg H₂O und die Harnmenge zwischen < 0,5 Liter und mehr als 20 l/d zu variieren und dem jeweiligen Bedarf anzupassen.

Dabei kann die Ausscheidung von Natrium 1 mmol/d oder, bei salzreicher Ernährung, bis zu 400 mmol/d betragen [78]

In der Niere ist die Exkretion und Rück-Resorption der einzelnen Elektrolyte in spezifischer Weise auf die unterschiedlichen Segmente des Organs verteilt:

In den proximalen Tubuli der Niere finden ca. 2/3 der Resorption des in den Glomerula abfiltrierten Wassers und Natriums statt. Daher spricht man auch vom sogenannten „proximalen Massentransport“, wobei der proximale Tubulus durch eine sehr große Transportkapazität gekennzeichnet ist.

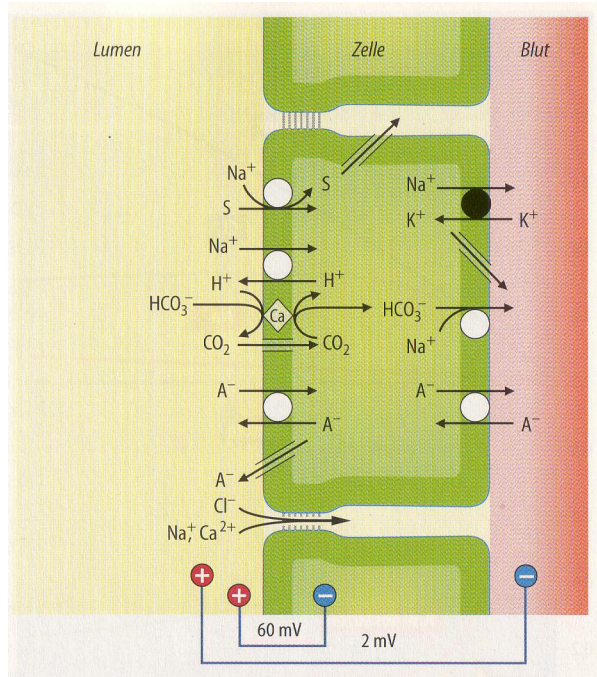


Abb. 2: Ionenaustausch und Transportprozesse an einer epithelialen Zelle der Niere
Aus: Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie

Die Aufgabe der Henle-Schleife distal des proximalen Tubulussystems ist vor allem die Harnkonzentrierung. Als wichtigster Schritt hierbei wird die NaCl-Resorption mit Hilfe des NaK₂Cl-Cotransporters im Wasser-impermeablen aufsteigenden Teil der Schleife angesehen.

Im distalen Nephron (distaler Tubulus, Verbindungsstück und Sammelrohr) erfolgt die Beförderung von Ionen gegen einen sehr hohen elektrochemischen Gradienten, aber es kann nur eine geringe Transportkapazität erreicht werden.

Die Kochsalzresorption geschieht im Verbindungsstück und Sammelrohr vor allem in den sogenannten Hauptzellen, die durch Na⁺- und K⁺-Kanäle gekennzeichnet sind.

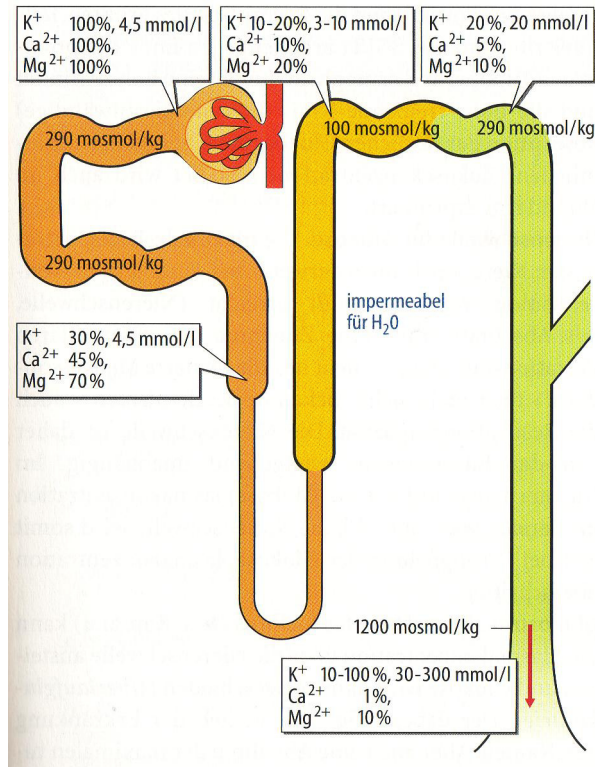


Abb. 3: Prozentualer Anteil der in den einzelnen Abschnitten des Nephrons rückresorbierten Elektrolyte

Aus: Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie

2.1.3 Epitheliale Regulierung des Zellvolumens

2.1.3.1 Klassifizierung von Epithelien

Wie unterschiedliche Versuche gezeigt haben [97]; [98]; [97]; [136], ist der Natriumgehalt bei Säugern in Epithelzellen höher als in Zellen anderer Gewebe. Bei Natrium transportierenden Epithelien unterscheidet man auf der Basis ihrer Charakteristika zwei verschiedene Klassen, wobei die Art der Verbindungen zwischen den einzelnen Zellen die Eigenschaften des Epithels bestimmen:

1. durchlässige Epithelien, über die hinweg große Ionen- und Wasserbewegungen stattfinden, und die einen minimalen elektrochemischen oder osmotischen Gradienten besitzen, (z.B. im Dünndarm oder im proximalen Tubulus der Niere), und
2. dichte Epithelien, die eine selektivere Elektrolyt-Bewegung erlauben, oft unter der Kontrolle verschiedener Hormone stehen, und auf Grund ihres hohen Gewebswiderstands spontan elektrische Potentiale von 50 - 100 mV oder

mehr generieren können und z.B. in der Harnblase von Säugern vorhanden sind [97]; 98].

Als allgemein anerkannte Nomenklatur von Epithelien in der Niere hat sich folgende durchsetzen können:

Das mit dem Urin in Kontakt stehende Epithel wird als Mukosa-Epithel oder apikale bzw. lumenale Membran bezeichnet; Serosa-Epithel oder basolaterale Membran wird das auf Seite der Blutkapillaren liegende Epithel genannt.

In Richtung von Mukosa zur Serosa herrschen passive Bewegungen; Transporte in der Gegenrichtung (von Serosa zur Mukosa) erfordern Energie und werden als aktive Sekretion bezeichnet, die auch die erleichterte Diffusion über Interaktionen mit spezifischen Membranbestandteilen beinhaltet [97]; [98].

2.1.3.2 Transepitheliale Transportprozesse

Um ein konstantes Gleichgewicht der einzelnen Ionen und osmotisch wirksamen Teilchen im Körper aufrechtzuerhalten, wird der Wassergehalt der Zellen mit Hilfe eines extrem präzisen Regulationsmechanismus kontrolliert [3].

Die Regulierung des Zellvolumens ist von entscheidender Wichtigkeit für die Langzeit-Regulation des Blutdrucks, der bei gesunden Erwachsenen in einem Bereich zwischen 10 und 15% des Normalwertes von 120/80 mmHg konstant gehalten wird.

Bei einem Anstieg des arteriellen Drucks scheidet die Niere mehr Wasser und Kochsalz aus als vom Körper aufgenommen wird und bewirkt dadurch eine Senkung des Blutvolumens mit nachfolgendem Blutdruckabfall [58]; [97]; [98].

Die Wirkung dieses Systems ist allerdings manchmal erst nach Stunden bis Tagen zu beobachten und unterliegt der Kontrolle bestimmter Hormone wie z.B. Aldosteron, das den transepithelialen Transport von Wasser und Ionen moduliert, (s. Kapitel 2.2).

2.2 Hormonelle Parameter: Überblick über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

2.2.1 Allgemeines

Mineralocorticoide sind Hormone, die in der Nebennierenrinde produziert werden und im Körper in den unterschiedlichsten Geweben vorhanden sind. Aldosteron, das in der Zona Glomerulosa synthetisiert wird, stellt dabei das potenteste natürlich vorkommende Mineralocorticoid dar. Seine Wirkung ist relativ spezifisch für die Konstanthaltung der Flüssigkeits-Mineralien-Balance im Körper und die Regulierung des arteriellen Blutdruckes [38], der zusätzlich auch von Glucocorticoiden wie z.B. Cortisol beeinflusst wird [40].

Außerdem ist der Salzgehalt in anderen Körpersekreten wie Schweiß, Speichel und Stuhl von der Wirkung des Aldosteron abhängig. Die Freisetzung des Hormons wird sowohl über die extrazellulären Konzentrationen von Na^+ , K^+ und ANP (Atriales natriuretisches Peptid), das einen schwachen Inhibitor der Aldosteronsekretion darstellt, reguliert, als auch durch das Renin-Angiotensin-System, (s.unten).

Die primären Effekte von Aldosteron werden durch intrazellulär gelegene Rezeptoren an der apikalen Seite der Zelle vermittelt [78]; diese „Andockstellen“ für Mineralocorticoide sind im Körper weit verbreitet, die Wirkweise der an sie bindenden Hormone allerdings ist bisher nur an Epithelzellen erforscht worden.

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist eine Kaskade proteolytischer Aktivierungen, als deren biologischer Effektor Angiotensin II (AT-II) angesehen wird. Dessen Haupteigenschaft ist die Regulierung des arteriellen Blutdruckes und des Extrazellulärvolumens (EZV); daneben zählt die Feinabstimmung der Volumenregulation des Körpers zu den bedeutendsten Aufgaben des RAAS.

Die Wirkungen des AT-II werden über AT_1 -Oberflächenrezeptoren vermittelt und sind sehr vielseitig:

-
1. Stimulierung der Natrium-Resorption im proximalen Tubulus der Niere.
 2. Stimulierung der Aldosteron-Produktion in der Nebennierenrinde und eine damit verbundene indirekte Förderung der Natrium- und Wasserresorption im Verbindungsstück und im Sammelrohr der Niere.
 3. Zerebrale Wirkungen, die eine Zunahme des Durstgefühls und des Salzappetits bewirken, wodurch wiederum die Natrium- und Wasserzufuhr des Körpers erhöht wird.
 4. Steigerung der ADH-Sekretion (Antidiuretisches Hormon) aus dem Hypophysenhinterlappen und eine dadurch verstärkte Wasserresorption im Sammelrohr der Niere.

Durch diese Mechanismen wird das Volumen des Extrazellulärraumes vergrößert, was eine mittelfristige Blutdruckerhöhung zur Folge hat.

5. Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen, eine damit verbundene Erhöhung des Kreislaufwiderstandes, die wiederum einen unmittelbaren (kurzfristigen) Blutdruckanstieg bewirkt.

Neben den AT₁-Oberflächenrezeptoren existiert eine zweite Gruppe, die sogenannten AT₂-Rezeptoren, die man vor allem in fetalen Zellen findet, und die der blutdrucksteigernden Wirkung des AT₁-Rezeptors entgegenwirken und somit zu einem Druckabfall in den Gefäßen führen.

2.2.2 Regulierung des RAAS

Die wesentliche physiologische Funktion des RAAS besteht in der Erhöhung des Extrazellulärvolumens und damit des arteriellen Blutdrucks.

Dies geschieht über eine Freisetzung von in den juxtaglomerulären Zellen der Niere synthetisiertem Renin, das als „Schlüsselregulator“ dient.

Stimuli für die Renin-Freisetzung sind:

1. Salzangel,

2. ein erniedrigter Nierenperfusionsdruck,

3. β_1 -adrenerge Stimuli durch Volumenveränderungen.

Blutdruckabfall über eine bestimmte Schwelle hinaus hat eine massive Steigerung der Reninfreisetzung zur Folge. Diese wird über eine erhöhte Sympathikusaktivität, (β_1 -adrenerg), und eine Aktivitätssteigerung sympathischer Nierennerven auch in Stresssituationen vermittelt. Als weitere wichtige physiologische Stimulatoren für die direkte Renin-Sekretion dienen Katecholamine, (Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin). Das System ist negativ rückgekoppelt, das heißt ein Salzüberschuss oder hypertensive Blutdrücke hemmen die Renin-Freisetzung wieder. Auch AT-II blockiert über die AT_1 -Oberflächenrezeptoren in negativer Rückkoppelung die Renin-Freisetzung.

Diese Wirkung lässt sich folgendermaßen erklären:

Angiotensinogen wird in AT-II umgewandelt, was eine vermehrte tubuläre Rückresorption von Kochsalz in der Niere induziert. Durch unter Einwirkung von AT-II aus der Nebennierenrinde freigesetztes Aldosteron wird die NaCl-sparende Tätigkeit der Niere noch unterstützt, indem eine Zunahme der Natrium-Rückresorption im distalen Tubulusabschnitt induziert wird.

Das RAAS ist bezüglich der Na^+ -Bilanz des Körpers das wichtigste regulatorische System, aber da die Natrium-Ausscheidung länger dauert als die Diurese von Wasser, sind die Wirkungen dieses Mechanismus' häufig erst nach Stunden bis Tagen erkennbar.

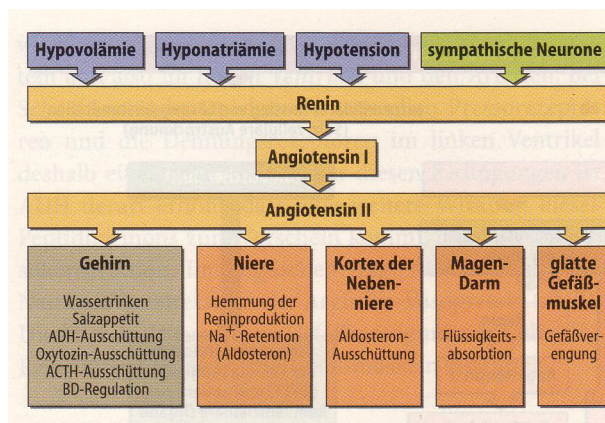


Abb. 4: Wirkmechanismen des RAAS zur Steigerung des arteriellen Blutdrucks
Aus: Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie

2.3 Aufbau des Mineralocorticoid-Rezeptors

1985 wurde die für den Glucocorticoid-Rezeptor (GR) codierende Gensequenz durch Hollenberg et al. entschlüsselt [64]; 1986 konnte sie von Miesfeld et al. [105] zur molekularen Klonierung des Rezeptors verwendet werden. 1987 entwickelte J. Arriza [7] einen Expressionsvektor (RShMR), der unter anderem die MR-Coding-Sequenz und den SV 40 (= simian virus 40) origin of replication enthält. Dadurch wurde die Klonierung und genauere molekulare Untersuchung auch des Mineralocorticoid-Rezeptors (MR) möglich gemacht.

Im selben Jahr gelang die Lokalisation des Gens, das für den Mineralocorticoid-Rezeptor codiert: Beim Menschen liegt es auf dem langen Arm von Chromosom 4 und dort an Position 31.1 und 31.2 [41]; [106].

Dieses Gen besteht bei einer Größe von 107 kD aus 984 Aminosäuren und besitzt große Ähnlichkeit mit dem GR-Gen, von dem es sich bei relativ gleich aufgebauten Regionen für DNA- bzw. Hormonbindungsstellen und einer Übereinstimmung der Nucleotid-Sequenz am COOH-Ende von 57% hauptsächlich durch einen langen Amino-Terminus unterscheidet.

Die DNA-Bindungsdomäne befindet sich nahe dieses Amino-Bereiches; die Domäne für die Hormonbindung ist am COOH-Terminus gelegen.

Zwischen diesen beiden für die Funktion des Rezeptors essentiellen Regionen befindet sich eine Sequenz, bei der eine relativ niedrige Nucleotid-Übereinstimmung mit dem Glucocorticoid-Rezeptor besteht: So sind beim MR dort 24 zusätzliche Aminosäuren vorhanden, die eine Sequenz von 4 Glutamin gefolgt von 8 Prolin enthalten.

Solche die Struktur des Proteins lockernde Proline sind charakteristisch für sogenannte **Hinge-Regionen**, die den Dreh- und Angelpunkt des Proteins darstellen [1].

In den 90er Jahren entdeckte man verschiedene Polymorphismen, die in Tabelle 1 aufgelistet sind. Alle in der Tabelle aufgeführten Varianten sind klinisch „stumm“, d.h. sie haben keinen pathologischen Effekt für die Genträger.

Polymorphismus	Lokalisation	Auswirkung auf die Proteinstruktur
del C / insT	Intron P1, Position 511/512	keine
T → C	Intron P1, Position 1118	keine
G → C	Intron A, Position 3514	keine
C → G	Exon 2, Position 8336	keine
A → G	Exon 2, Position 8915	Ile → Val, Position 180
C → T	Exon 2, Position 9099	Arg → Val, Position 241
C → T	Exon 2, Position 9874	Asp, Position 499 (silent)

Tab. 1: Polymorphismen im MR-Rezeptor
Nach: Ludwig 1998

Die Bedeutung dieser Genveränderungen wurde in einigen Studien untersucht, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führten:

So konnten Ludwig et al. [93] zwei der bereits von Arai et al. beschriebenen Polymorphismen [4] bei ihren Untersuchungen nicht finden.

In vitro zeigte sich, dass der MR eine signifikante Affinität für sowohl Mineralo- als auch Glucocorticoide aufweist [48]; [14], und weitere Untersuchungen ergaben, dass der bevorzugte physiologische Ligand des Rezeptors von dessen Expressionsort im Körper abhängig ist:

So werden im Gehirn hauptsächlich Glucocorticoide gebunden, in der Niere dagegen hauptsächlich Mineralocorticoide, (vor allem Aldosteron) [48].

An Hand dieses Modells lässt sich die Sensitivität mancher Gewebe für Aldosteron (und nicht für Glucocorticoide) trotz erheblich höherer konkurrierender Glucocorticoid-Konzentrationen erklären.

Die physiologische Verteilung des MR im Körper beinhaltet neben den Zielgeweben für Mineralocorticoide wie Darm und Niere, (hier allerdings nur die Zellen in den distalen und corticalen Sammelrohren), auch Teile des Gehirns, (vor allem den Hippocampus), die Epiphyse, sowie Herz, Aorta und Milz und unterscheidet sich damit deutlich von der GR-Verteilung [7].

Während man 1985 noch von einer rein zytosolischen Lokalisation des MR ausging [6], hat sich mittlerweile folgendes Modell durchgesetzt:

Die Zellmembran Mineralocorticoid-sensitiver Gewebe enthält Bindungsstellen für Aldosteron, (etwa 100 – 200 pro Zelle), die einen sehr schnellen Turnover von Assoziation des Hormons an den Rezeptor und nachfolgender Dissoziation zeigen, (innerhalb von 1 –2 Minuten). Zusätzlich sind im Zytosol und im Kern gelegene Rezeptoren vorhanden, die den genomischen Teil der Aldosteronwirkung vermitteln, (s. Kapitel 2.2).

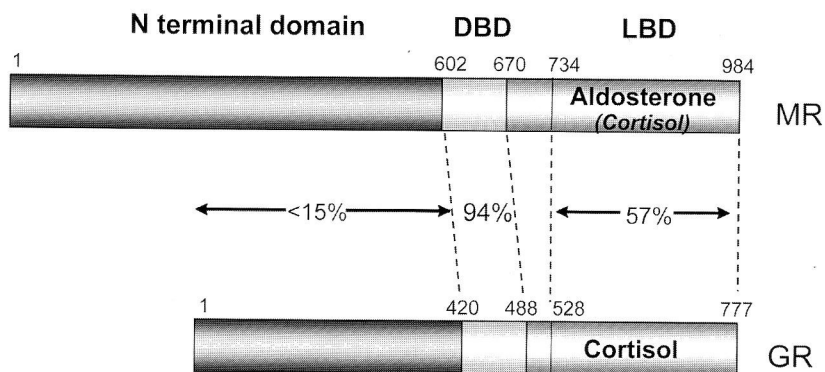


Abb. 5: Schematischer Vergleich des Mineralo (MR)- mit dem Glucocorticoid (GR)-Rezeptor
 DBD: DNA-Bindungs-Domäne; LBD: Ligand-Bindungs-Domäne
 Die Zahlen bezeichnen die Anzahl an enthaltenen Aminosäuren
Aus: Kuhnle 2004

2.4 Aufbau des Amilorid-sensitiven epithelialen Natrium-Kanals (ENaC)

2.4.1 Äußeres Erscheinungsbild und Verteilungsmuster im Gewebe

Der epitheliale Amilorid-sensitive Natrium-Kanal (ENaC) gehört der großen Familie der DEG/ENaC-Gene an, die in vier verschiedene Gruppen unterteilt wird [44]:

1. Gene, die an der Na^+ -Absorption über Epithelien beteiligt sind,
2. Gene, die für spannungsunabhängige Natriumkanäle im Gehirn codieren, (BNaC1 und BNaC2) [154],
3. die Degenerine MEC-4, MEC-10 und DEG-1 von *C. elegans* [146] und
4. FRMFamid-Peptid gesteuerte Natriumkanalgene (FaNaCh) der Schnecke *Helix aspera* [91].

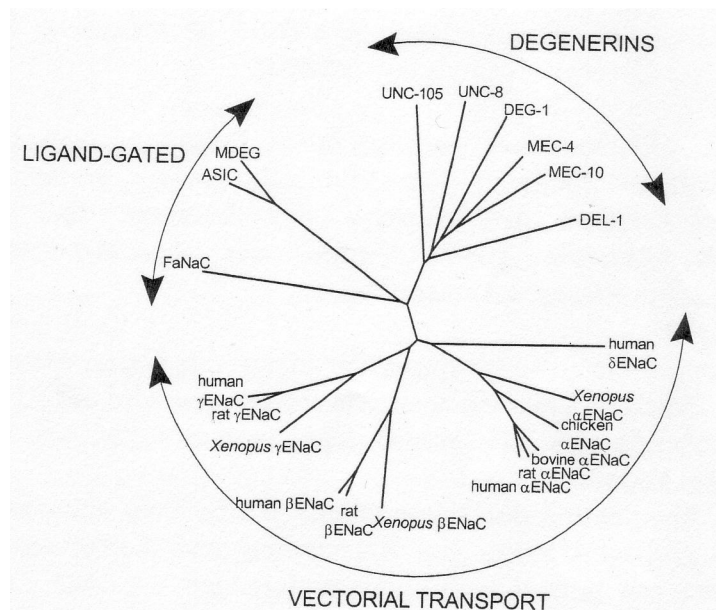


Abb. 6: Stammbaum der DEG/ENaC-Gene

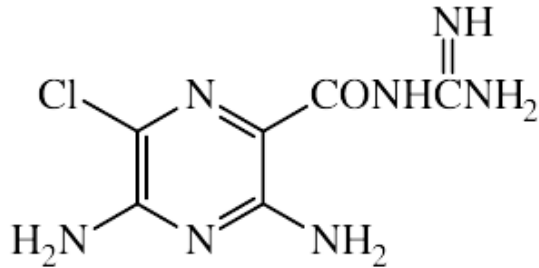
Aus: Barbry 1997

In fast allen dichten Epithelien des menschlichen Körpers, d.h. Epithelien, in denen der parazelluläre elektrische Widerstand gleich oder sogar größer ist als derjenige der Zellmembran, sind ebenfalls solche Natriumkanäle vorhanden. Ihre Funktion ist die Aufrechterhaltung der Salz- und Wasserhomöostase des Körpers. Klinische Bedeutung haben sie durch die Entdeckung erlangt, dass zwei Erbkrankheiten, (Liddle's Syndrom und Pseudohypoaldosteronismus Typ I), auf Mutationen der für ENaC codierenden Gene beruhen.

Diese Kanäle sind in die Membran eingebettete Protein-Komplexe, die sich in drei Gruppen einteilen lassen [51]:

- a) Kanäle mit hoher Natrium-Selektivität gegenüber Kalium, ($P_{Na^+}/P_{K^+} \geq 10$), geringer Einzelkanal-Leitfähigkeit, (~ 5 pS, gemessen mit Patch-clamp-Technik) und langen Öffnungs- bzw. Schließungszeiten, (0,5-5,0 s).
- b) Kanäle mit mittlerer Selektivität für Natrium, ($P_{Na^+}/P_{K^+} = 3-4$), höherer Einzelkanal-Leitfähigkeit, (7-15 pS) und kürzeren Öffnungs- bzw. Schließungszeiten, (≤ 50 ms).
- c) Nichtselektive Kationen-Kanäle, ($P_{Na^+}/P_{K^+} \leq 1,5$), mit unterschiedlicher Leitfähigkeit, die entweder hoch, (23-28 pS), oder sehr niedrig, (≤ 3 pS) ist.

Gemeinsam ist allen Kanälen ihre Blockierungsfähigkeit durch das Diuretikum Amilorid, wobei bereits geringe Dosen ausreichen, ($K_i \leq 0,5 \mu\text{M}$, d.h. halbmaximale Blockierung bei Amilorid-Konzentrationen von $0,1 - 0,5 \mu\text{M}$), um eine Funktionsunfähigkeit dieser Membranproteine zu bewirken.



AMILORIDE

Abb. 7: Strukturformel von Amilorid

Aus: Internet

Wie verschiedene Studien gezeigt haben, ist die Verteilung von ENaC im Körper für die einzelnen Kanalgruppen ganz unterschiedlich, und die Art der den Kanal exprimierenden Gewebe trägt zu seiner Klassifizierung bei:

So findet man zum Beispiel im Epithel der Nasenschleimhaut einen Kanaltyp, der sich durch eine geringe Ionenselektivität, ($\text{Na}^+/\text{K}^+ < 2$), eine hohe Leitfähigkeit, (9 – 12 pS), und kurze Öffnungszeiten, (< 50 msec), auszeichnet [1].

Vertreter der Kategorie a), (Natriumkanäle mit hoher Selektivität), sind in vielen Natrium-absorbierenden Epithelien vorhanden, z.B. Haut und Harnblase von Amphibien [88], A6-Zellen (*Xenopus*-Nierenzellen), wenn sie auf permeablen Nährböden gezüchtet wurden [59], Ratten-Sammelrohren [115], renalen proximalen geraden Tubuli [54] im Enddarm von Säugern, Amphibien und Vögeln [52] und in Ratten-Lungen [153].

Im Ileum von Ratten wurde an der apikalen Membran ebenfalls eine Amilorid-sensitive Leitfähigkeit festgestellt, die wie in dichten Epithelien durch Aldosteron reguliert wird [155].

Kanäle in diesen Epithelien öffnen und schließen nicht spontan in der gleichen Frequenzspanne wie bei Anwesenheit von Amilorid, sondern es herrscht eine Fluktuation von geringer Frequenz [89].

Kanäle mittlerer Natrium-Selektivität, (Kategorie b)), wurden beschrieben für A6-Zellen [59], Kaninchen-Sammelrohre [90], Alveolarzellen Typ II [101] und angezüchtete menschliche Schweißdrüsenzellen [69].

Die dritte Gruppe, (Kategorie c)), konnte bisher in nur zwei verschiedenen Geweben lokalisiert werden:

1. bei Ratten in Sammelrohren des inneren Markbereichs (IMCD) [87] und
2. in Kulturen von epithelialen Zellen der Blut-Hirn-Schranke [152].

In Zellkulturen von Schilddrüsen fanden sich ebenfalls nichtselektive Ionenkanäle [151], die sich aber durch ihre sehr geringe Leitfähigkeit (2,6 pS) von den oben genannten unterscheiden.

2.4.2 Molekularer Aufbau des epithelialen Natriumkanals

Cecilia M. Canessa und Pascal Barbry waren die ersten Wissenschaftler, denen es gelang, die molekulare Struktur des epithelialen Natriumkanals (ENaC) zu entschlüsseln [24] und [11].

Es handelt sich dabei um ein hetero-oligomeres Protein, das aus mindestens drei verschiedenen Untereinheiten besteht, (α -, β - und γ -Untereinheit), die auf der Ebene ihrer Aminosäuresequenz miteinander zu 35% identisch sind.

Quantitative Expressions-Analysen jeder Subunit auf der Zelloberfläche zeigten, dass der Kanal gemäß einer fixen Stöchiometrie aufgebaut ist. Dabei ist die α -Untereinheit in der Zellmembran am häufigsten vertreten.

Firosov et al. konnten an Hand zweier unterschiedlicher Ansätze die genaue stöchiometrische Zusammensetzung des ENaC aufklären [44]:

Es zeigte sich, dass die Genloci Ser583 in der α -Untereinheit, Gly525 in der β - und Gly537 in der γ -Untereinheit entscheidend an der Bildung der ionenleitenden Kanalpore beteiligt sind, denn eine Substitution dieser Genorte durch Cystein führt zu einer veränderten Bindungsstelle und einem starken Anstieg der Affinität für Zi^+ , ($K_i =$

30 μM), wodurch der Kanal entweder komplett blockiert, oder seine Leitfähigkeit zumindest deutlich herabgesetzt wird [133].

Patch-clamp-Analysen zeigten, dass der Amilorid-sensitive Natriumstrom bei Expression von Kanälen, die nur aus zwei Untereinheiten ($\alpha\beta$ oder $\alpha\gamma$) bestehen, nur höchstens 5% desjenigen Stroms ausmacht, der bei Coexpression aller drei Untereinheiten gemessen werden kann. Kanäle, die gar keine α -Untereinheit besitzen, erzeugen keinen signifikant messbaren Natriumstrom [44].

Weiterhin stellten Firsov et al. fest, dass die einzelnen Untereinheiten untereinander nicht austauschbar sind, und dass sich das Aussehen der Kanäle nicht verändert, selbst wenn die 100-fache Menge mRNA für eine bestimmte Untereinheit zugegeben wird.

Das lässt ebenfalls den Schluss zu, dass die Bildung von ENaC einem fest vorgegebenen Muster folgt, wobei sich die einzelnen Untereinheiten in einer pseudosymmetrischen Anordnung um die Kanalpore ($\alpha\beta\alpha\gamma$ -Konfiguration) zu einem Hetero-Tetramer verbinden.

Dies konnte man durch Versuche zeigen, bei denen sich in-vitro-translatierte α -Untereinheiten selbständig zu funktionalen Kanälen in Liposomen zusammenfügten [67]; [68].

Über die Beschaffenheit des innersten Leitungs-Elements der Kanalpore herrschte lange Zeit Unklarheit, bis Berdiev 1998 dessen Struktur näher aufklären konnten [17]: So waren unter Verwendung einer Ratten-ENaC-Mutante, der in der α -Untereinheit der N-Terminus fehlt ($\alpha\Delta_N$ -rENaC), die Öffnungs- bzw. Schließungszeiten des Kanals signifikant niedriger als beim Wildtyp (WT), woraus man folgerte, dass der N-Terminus für die Schleusenfunktion von ENaC eine wichtige Rolle spielt.

Durch Lösung der sie verbindenden Disulfid-Brücken trennen sich die einzelnen Leitungs-Elemente voneinander und verteilen sich beim Wiedereinbau in einen planaren Bilayer (z. B. der Zellmembran) in zufälliger Anordnung zwischen den Proteoliposomen der Membran. Das hat eine einheitliche Einzel-Leitfähigkeit, aber keine Änderung in der Ionenselektivität oder der Amilorid-Sensitivität der Kanäle zur Folge.

Sind dagegen die Disulfid-Brücken intakt, stellt der Kanal ein komplexes Agglomerat von mehr als einer Leitungseinheit dar.

Aus der Beobachtung, dass die Dosis-Effekt-abhängige Amilorid-Hemmkurve sich bei Substitution einzelner Wildtyp-Untereinheiten durch mutierte Subunits verändert, schloss Berdiev, dass jede Untereinheit für sich, unabhängig von den anderen, mit Amilorid reagiert.

Wie diese Bindungsstellen für das Diuretikum genau aussehen, ist immer noch umstritten:

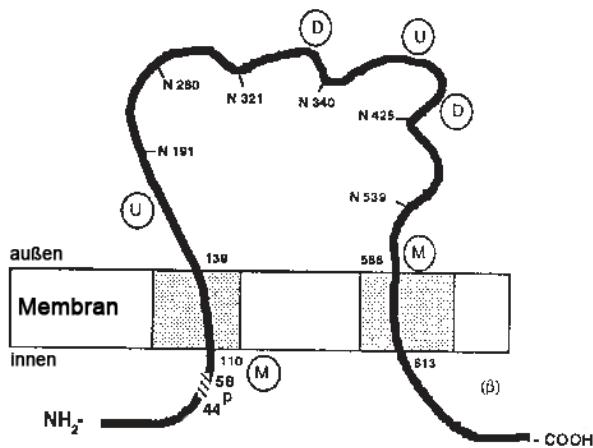
Einer Hypothese zufolge trägt jede der vier Untereinheiten von ENaC zur Bildung einer einzigen Amilorid-Bindungsstelle bei [17].

Das steht im Widerspruch zum sogenannten **Molecular-Plug-Modell**, nach dem sich eine Bindungsstelle für Amilorid innerhalb des elektrischen Felds der Kanalpore selbst befindet und an den Guanidin-Teil des Amilorid-Moleküls bindet. Eine weitere Stelle an der extrazellulären Oberfläche des Kanals außerhalb der Pore „stabilisiert“ die durch Amilorid verursachte Blockierung des ENaC durch Interaktion mit dem Pyrazin-Teil des Diuretikums [17].

Da das Amilorid-Molekül nicht symmetrisch aufgebaut ist, (s. Abb.7), bildet es wahrscheinlich keine kovalenten Brücken an den vier Bindungsstellen im Kanal gleichzeitig.

Man geht vielmehr davon aus, dass andere, nicht kovalente Bindungen zwischen Amilorid und vielen ENaC-Untereinheiten herrschen, wodurch sich auch die Reversibilität der Kanal-Blockierung erklären ließe [17].

Jede Subunit besitzt jeweils einen kurzen COOH- und NH-Terminus, die beide intrazellulär liegen, zwei Transmembrandomänen und eine große N-glykosylierte extrazelluläre Schleife [123]; [140], (s. Abb. 8).



α -ENaC

Abb. 8: Struktur der α -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals (ENaC)

Aus: Agarwal 1999

Die im Zytosol gelegene C-terminale Domäne aller Untereinheiten enthält zwei Prolin-reiche Sequenzen (P_1 und P_2) [62]:

Das sind Minimal-Konsensus-SH₃-Domänen (P_1 ; PXXP) und ein PY-Motiv (P_2 ; PPPXY), die in Ubiquitin-Proteinen mit der Isopeptid-Ligase interagieren [102]; [143];[42].

Die P_1 -Region der α -Untereinheit, (aber nicht die der β - oder der γ -Untereinheiten), interagiert mit α -Spektrin, das den Transfer der Subunit zur luminalen Plasmamembran bewirkt [127].

Einer Reihe unterschiedlicher Studien zufolge ist der C-Terminus des ENaC entscheidend für die Down-Regulierung der Aktivität des Kanals:

Es wurden evolutionär konservierte Tyrosin und Serin/Threonin-Reste im kombinierten PY-Motiv und endozytischen Motiven (PPPXYX(TIS)L) identifiziert, welche die Kanalaktivität beeinflussen, wenn sie unterschiedlich phosphoryliert sind [138]; [137].

Das Gen, das beim Menschen für die α -Untereinheit des Kanals codiert (h α ENaC-Gen) umfasst 17 kb auf Chromosom 12p13 [104]; [153] und besteht aus 13 Exons, die eine Größe zwischen 45 bp (Exon 1) und 1406 bp (Exon 13) besitzen.

Exon 1 wird nicht translatiert und fällt durch einen extrem hohen Gehalt (82,2%) an Guanidin/Cytosin auf.

Neben den zehn Intronbereichen, auf die in Kapitel 2.5.2 näher eingegangen wird, postuliert man die Existenz von mindestens acht Alusequenzen. Das sind spezielle Basenabfolgen (5'AGCT 3'), die durch die Restriktionsendonuclease **Alu I**, (aus *Arthrobacter luteus*), geschnitten werden und glatte Enden (**blunt ends**) haben.

2.4.3 Biophysiological Funktion von ENaC

Die Hauptaufgabe des epithelialen Natriumkanals ist die Absorption und Resorption von Natrium, d.h. der kontrollierte Eintritt dieses Kations in die Zellen verschiedener Epithelien aus der Umwelt oder aus transzellulären (luminalen oder mukosalen) Flüssigkeiten wie Urin, Fäces, Schweiß, Speichel und Lungensekret.

Durch die Aktivität des Kanals wird die Zusammensetzung der vom Körper ausgeschiedenen Flüssigkeiten geregelt: Steigt die aufgenommene Flüssigkeitsmenge, nimmt die Natrium-Resorption ebenfalls zu.

Der vektorielle transzelluläre Na^+ -Transport wird vor allem durch Mineralocorticoide beeinflusst: Hierbei erfolgt die Koppelung des limitierenden Schrittes, (der passiven Elektrodifusion von Natrium durch die apikale Zellmembran), mit der aktiven Ausschleusung des Kations aus der Zelle durch die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase. Im Gegensatz zu den spannungsabhängigen Natriumkanälen in erregbaren Geweben (Muskeln, Nerven) ist der ENaC nicht spannungsabhängig, sondern wird durch Hormone, Ionen und Zellsignalmechanismen reguliert [1].

Man geht davon aus, dass der Natriumkanal in verschiedenen Zustandsformen existiert:

1. leitend
2. halbleitend
3. nicht leitend
4. „schlafend“
5. aktiv
6. Amilorid-blockiert
7. leer
8. mit Kationen beladen

Außerdem scheint es die Möglichkeit der Interkonvertibilität zwischen selektiven und nichtselektiven Kanälen durch post-translationale Modifikationen zu geben, d.h. eine Umwandlung der einen in die andere Form ist denkbar, selbst wenn der Kanal bereits als fertiges Protein vorliegt [1].

Eine Theorie besagt, dass die selektiven Kanäle der Kategorie a) (Natriumkanäle mit hoher Selektivität) im Laufe der Zeit in solche der Kategorie b) mit mittlerer Selektivität umgewandelt oder durch sie ausgetauscht werden, was eventuell durch proteolytische Degradationsprozesse möglich ist [132].

Zwei weitere Beobachtungen sprechen für eine Interkonvertibilität zwischen den Kanälen der einzelnen Kategorien:

1. Es wurden ENaC aus der apikalen Membran von A6-Zellen in Lipid-Bilayer eingebaut, woraufhin diese Membranen Kanäle mittlerer Selektivität, (Kategorie b)) exprimierten, obwohl in den Ursprungszellen hauptsächlich hochselektive Kanäle (Kategorie a)) vorhanden gewesen waren [128].
Daraus schloss man, dass die Ionen-Selektivität ein labiles Charakteristikum ist, das durch die Isolierung z.B in Reagenzröhrchen und den Wiedereinbau in eine biologische Membran verlorenght [36].
2. Aus A6-Zellen isolierte mRNA führte zur Expression von hochselektiven Natriumkanälen (Kategorie a)) in Xenopus-Oozyten [114].
Da die Epithelien dieser Zellen in vivo vor allem Kanäle der Kategorie b) exprimieren, geht man jetzt davon aus, dass dieselbe mRNA sowohl hochselektive ENaC als auch solche mittlerer Selektivität codieren kann.

Bei Versuchen mit Kanälen aus Krötenblasen zeigte der ENaC folgende Ionenselektivität:

$H^+ > Li^{2+} > Na^+ \gg K^+$ mit einer Na^+/K^+ -Ratio von 1000/1.

Zusätzlich zu dieser hohen Selektivität für Natrium hat der Kanal die Eigenschaft, nicht einmal für kleine organische Kationen (Hydroxyl-Ammonium oder Hydrazin) permeabel zu sein, im Gegensatz zum spannungsabhängigen Na^+ -Kanal in erregbaren Geweben, den solche Ionen leicht passieren können [63]; [49]; [113]; [16]; [53].

Den Natrium-Fluss durch die leitende Pore des Kanals stellt man sich als einfache, eindimensionale Diffusion in einem konstanten elektrischen Feld vor, die im Austausch mit einer Kalium-Ausschleusung aus der Zelle über K^+ -Kanäle in der basolateralen Membran stattfindet [34]; [36], (s. Abb. 9).

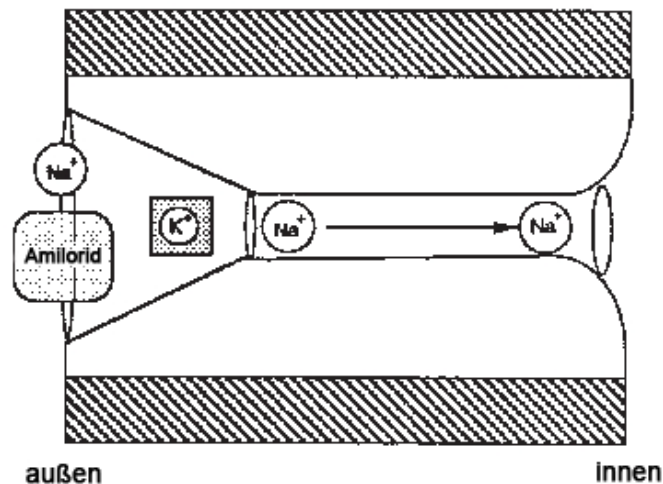


Abb. 9: Schematische Darstellung der Kanalpore und der Amilorid-Bindungsstelle
Aus: Agarwal 1999

2.4.4 Inhibierbarkeit durch Amilorid

Amilorid (3,5-Diamino-6-Chloro-Pyrazinoylguanidin), (s. Abb.7), ist ein kaliumsparendes Diuretikum, das auf Pyrazin basiert und zur Behandlung von Hypertonie, Herzinsuffizienz und Leberzirrhose eingesetzt wird. Es entfaltet seine Wirkung sowohl im distalen Tubuluskonvolut als auch im Sammelrohr der Niere und wird unverändert im Urin ausgeschieden. Neben einer erhöhten Urinproduktion bewirkt das Medikament eine gesteigerte Chlorid-Ausscheidung [1].

Weitere wichtige Eigenschaften von Amilorid sind seine natriuretische Wirkung und Kalium-Retention.

Der Wirkmechanismus in dichten Epithelien beruht auf einer kompetitiven Hemmung von Natrium durch Bindung des Diuretikums an den COOH-Terminus der apikalen Pore aller Kanaltypen, jedoch mit unterschiedlichen Affinitätsgraden, (s. Abb. 9).

Dabei dringt die positiv geladene Guanidingruppe des Medikaments in die negativ geladene Kanalpore ein, mit einer Dissoziations-Gleichgewichts-Konstanten von $K_i < 1\mu M$, wodurch eine 50%ige Hemmung des Natriumtransports erreicht werden

kann, sofern die Natriumkonzentration in der Zelle physiologischen Bedingungen entspricht.

Die Interaktion zwischen der Na^+ -Eintrittsstelle im Kanal und Amilorid ist sehr komplex: Man geht davon aus, dass die Amilorid-Bindungsstelle wahrscheinlich an den Aminosäuren 278-283 der Kanalpore liegt [68].

Die Raten für die Konstanten des „An“- bzw. „Aus“- Zustandes der Kanäle infolge der Amilorid-Blockierung wurden mit Hilfe von Geräusch-Analysen auf folgende Werte geschätzt: $20 \mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ (k_{an}) für den aktivierten Zustand und 10sec^{-1} (k_{aus}) für die inaktivierte Phase; eine detailliertere Analyse der Blockierungskinetik wurde bisher nur für Amilorid-Analoga durchgeführt [83];[84].

Messungen mit Patch-Clamp-Technik ergaben ähnliche Ergebnisse [46]; [59];[115].

Interessant ist auch die Beobachtung, dass sich die Amilorid-Sensibilität unterschiedlicher Zell- und Gewebetypen erst mit zunehmendem Alter entwickelt [53] und durch Gabe von Spironolacton verhindert werden kann.

Durch Amilorid werden außerdem gehemmt: Die elektrogenen Na^+/H^+ -Symporter, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Symporter und das elektrisch neutrale Na^+/H^+ -Austauschsystem [1].

2.4.5 Regulationsmechanismen von ENaC

Die Mechanismen und Vorgänge zur Steuerung und Aktivitätsregulierung des epithelialen Natriumkanals konnten bis heute noch nicht komplett aufgeklärt und verstanden werden.

Allerdings existieren bereits präzise Modelle über einzelne Regulationswege und darin involvierte Hormone bzw. Proteine.

So gilt als gesichert, dass der Natriumkanal für weniger als 5% der Salz-Resorption im Körper verantwortlich ist, ein scheinbar sehr geringer Anteil, der aber im Hinblick auf ENaC-Funktionsstörungen wie Liddle's Syndrom oder Pseudohypoaldosteronismus und ihre erheblichen Auswirkungen auf die Salz- und Wasserhomöostase nicht unterschätzt werden darf [56].

Grundsätzlich kann man zwei verschiedene Regulationswege unterscheiden:

Zum einen die Steuerung der Kanaldichte in der Zellmembran, die den Hauptmechanismus der klassischen hormonellen Kontrolle der Natrium-Absorption darstellt, zum anderen die Steuerung der Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle. Die ENaC-Inaktivierung durch steigende extrazelluläre Na⁺-Konzentration stellt eine intrinsische in hohem Maße temperaturabhängige Eigenschaft des Kanals dar und kann durch Behandlung mit extrazellulären Proteasen gestört werden [29], sodass man heute von zwei verschiedenen Zustandsformen des ENaC ausgeht: Eine mit hoher Öffnungswahrscheinlichkeit und eine, bei der die Öffnungswahrscheinlichkeit niedrig ist [116]; [117].

Aus der Vielzahl der Mediatoren für die Steuerung des Salz-Transports in der Niere ist neben Vasopressin (= ADH), Insulin und ANP (atriales, natriuretisches Peptid) [53]; [126], einer der wichtigsten Transmitter Aldosteron, ein Mineralocorticoid, das in der Nebennierenrinde produziert und dann ins Blut abgegeben wird, (s.Kapitel 2.2).

Interessanterweise, sind von Aldosteron induzierte Effekte abhängig vom jeweiligen Zielgewebe. So werden die einzelnen Untereinheiten des ENaC auf unterschiedliche Weise durch Aldosteron stimuliert:

In der Niere lässt sich vor allem eine verstärkte Induktion für die Expression der α -Untereinheit in den Zellen nachweisen, im Kolon dagegen werden nur die β - und die γ -Untereinheiten durch Aldosteron stimuliert.

Versuche zeigten weiterhin, dass in der Lunge alle drei Subunits des ENaC zwar durch Glucocorticoide, jedoch nicht von Aldosteron reguliert werden [47].

Die durch Aldosteron ausgelöste Aktivierung des epithelialen Natriumkanals erfolgt über durch das Hormon induzierte Zwischen-Proteine, wobei das vor allem die Serum- und Glucocorticoid-induzierte Kinase (SGK) und kleine G-Proteine, (z.B. K-Ras 2A), sind, (s. unten).

Andere mit ENaC interagierende Mechanismen beinhalten z.B. die in der Zellmembran verankerte Kanal-aktivierende Protease 1 (CAP-1) und den CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator).

Die Funktionen dieser und anderer Hormone bestehen aus zwei unterschiedlichen Prinzipien: Die Kurzzeit- und die Langzeitwirkung.

Während die Kurzzeiteffekte mit der Regulierung des Traffickings (der Insertion der Kanäle in die Zellmembran) oder mit posttranslationalen Modifikationen von

Transportproteinen assoziiert sind, besteht die Langzeitwirkung hauptsächlich aus einer Steigerung der Anzahl solcher Transportproteine [56].

Die Antwort des Natriumkanals auf die Aldosteron-Wirkung lässt sich in drei Phasen unterteilen:

1. die Latenzphase, die ca. 45 Sekunden dauert, und in der keine Effekte sichtbar sind,
2. eine frühe Antwortphase, (45 Minuten – 3 Stunden) und
3. eine späte Antwortphase, (mehrere Stunden – mehrere Tage nach Therapiebeginn) [150].

Diese späte Phase ist verbunden mit der spezifischen Akkumulation von mRNA der α -Untereinheit von ENaC, der eine gesteigerte Salz- und Wasserresorption des Körpers vorangeht.

Neuere Studien zeigten, dass auch Angiotensin II (AT II) eine entscheidende Rolle bei der Steigerung bzw. Hemmung der Aktivität des Natriumkanals spielt:

Neben den extrarenalen Effekten dieses Hormons auf die Blutdruckregulation, wo AT II als Vasokonstriktor und Regulator der Aldosteron-Sekretion fungiert, lassen sich auch Wirkungen an den Nierentubuli selbst nachweisen, die einen Einfluss auf die NaCl-Resorption haben [61].

Dabei wird die antinatriuretische Wirkung des Angiotensins durch die Bindung des Hormons an den AT-Rezeptor Typ 1 (AT₁-Rezeptor) vermittelt [109].

Als Langzeitwirkung von AT II bei der Regulierung der Anzahl an ENaC-Untereinheiten in der Zellmembran zeigte sich eine verstärkte Expression der α -Untereinheit sowohl auf der Protein- als auch auf mRNA-Ebene bei gleichzeitiger Absenkung der Anzahl der β - und γ -Untereinheiten [19].

Außerdem bewirkt die Zugabe von Aldosteron bei Salzrestriktion eine sehr ausgeprägte Hochregulierung der α -Untereinheit auf Protein- und mRNA-Ebene und wird deshalb zusammen mit der Besetzung des AT₁-Rezeptors durch Angiotensin als Hauptfaktor für die Kanal-Induktion angesehen.

Blockiert man den AT₁-Rezeptor durch Candesartan (Atacand[®], Blopress[®]), zeigt sich erwartungsgemäß eine Abnahme der Anzahl an α -Untereinheiten, die mit einer Änderung in den korrespondierenden mRNA-Levels assoziiert ist und nicht durch den Mineralocorticoid-Rezeptor-Blocker Spironolacton beeinflusst werden kann.

Dabei steigt interessanterweise die Zahl der β - und γ -Untereinheiten an, was nicht mit Änderungen auf mRNA-Ebene verbunden ist und durch Spironolacton verhindert werden kann [19].

Daraus ergibt sich, dass die Anzahl der einzelnen Untereinheiten durch zwei voneinander unabhängige Prozesse reguliert wird [37]; [71].

Neben den Regulationsmechanismen durch Hormone kann der epitheliale Natriumkanal auch durch Selbstinhibition gesteuert werden:

Darunter versteht man eine schnelle Kanalregulierung, die durch die extrazelluläre Na^+ -Konzentration bestimmt wird.

Wie Chraibi et al. [29] zeigen konnten, ist diese Selbstinhibition temperaturabhängig:

Der Amilorid-sensitive Gleichgewichtsstrom des Kanals ist bei niedrigen Temperaturen größer als in warmem Medium, und die Anzahl an offenen Kanälen steigt mit sinkender Temperatur. Dagegen scheint die Einzelkanal-Leitfähigkeit gleichgerichtet mit der Temperatur zu sein, d.h. bei Temperaturabfall nimmt sie ab.

Zusammenfassend ergaben die Versuche von Chraibi et al. also für Temperaturänderungen ein duales Effektmuster auf den ENaC, das auf Konformationsänderungen des Kanals beruht:

Einerseits sinken die Leitfähigkeit und der messbare Einzelkanalstrom bei Abkühlung der Perfusionslösung um das 2,1-Fache; auf der anderen Seite steigt die Öffnungswahrscheinlichkeit um den Faktor 2,55 an, was kompatibel mit dem von Chraibi gemessenen Wert einer Steigerung um den Faktor 1,37 ist.

In den letzten Jahren wurde durch intensive Forschung neben den schon seit langem bekannten für die Regulation des epithelialen Natriumkanals entscheidenden Hormonen auch eine Reihe an zusätzlichen Faktoren und Proteinen entdeckt, die in die Regulationskaskaden für ENaC eingebunden sind:

Ein Beispiel hierfür ist die SGK1 (Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase 1), deren Gen auf Chromosom 6q23 lokalisiert ist und für ein Protein aus 431 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 49 kDa codiert.

Daneben existieren zwei weitere Isoformen: SGK2 und SGK3, deren zugehörige Gene auf Chromosom 20 bzw. 18 lokalisiert sind.

Allerdings zeigte sich, dass nur die Isoform SGK1 für die Regulierung des epithelialen Natriumkanals relevant ist. Die Wirkung sind direkte von Aldosteron induzierte Effekte auf die Genexpression innerhalb von 30 Minuten [27]; [108]: Die Zahl der Kanäle in der Plasmamembran erhöht sich unter SGK-Einfluß auf das Dreifache, und der induzierte Strom steigt auf das Doppelte.

Um eine Aktivierung des epithelialen Natriumkanals erreichen zu können, muss die SGK1 zuerst selbst aktiviert werden. Das erfolgt durch Phosphorylierung durch die sogenannte PI-3-Kinase [72].

Interessanterweise scheint die SGK-Aktivität auch mit dem Inselzellhormon verknüpft zu sein, wie Studien von Park et al. [118] gezeigt haben.

SGK reguliert wohl das ENaC-Regulationsprotein hNedd4-2 (human neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4-2), das zur Gruppe der Ubiquitin-Ligasen gehört. Es stellt einen wichtigen Vermittler des ENaC-Turnovers in der Zellmembran dar, indem es an spezifische PY-Motive im C-Terminus der drei Untereinheiten des epithelialen Natriumkanals andockt.

SGK1 bindet wiederum mit seinem eigenen PY-Motiv an die Ubiquitin-Ligase und phosphoryliert sie auf diesem Weg [141].

Dadurch wird die Bindung von α ENaC an hNedd4-2 gelockert, die Ubiquitinierung des Kanals sinkt, wodurch die Dichte der Natriumkanäle an der Plasmamembran und damit die Salzabsorption ansteigen [78].

Bei der Downregulation des Kanals über Endozytose und Degradation spielt das Nedd4-Protein ebenfalls eine entscheidende Rolle [56]. Studien ergaben, dass weder die Isoform Nedd4-2 noch das nah verwandte Nedd4-1 auf transkriptioneller Ebene durch Aldosteron reguliert wird [47].

Weitere akzessorische ENaC-Regulatoren sind:

1. K-Ras2, das der Ras-Superfamilie angehört, einer Reihe von kleinen GTP-bindenden Proteinen, die durch GTP-Bindung aktiviert und durch hydrolytische Spaltung des Bindungsproduktes zu GDP wieder inaktiviert werden. Den Ras-Proteinen kommt eine Funktion als „Schalter“ in vielen molekularen Aktivierungskaskaden zu.

-
2. K-Ras2-A, das eine Spleiß-Variante von K-Ras2 und eine der vier RNAs darstellt, die durch Nebennieren-Steroide aktiviert werden können (ASURs = adrenal steroid up-regulated RNA) [142]. K-Ras2-A hat gegensätzliche Effekte auf den ENaC:

Einerseits senkt es die Anzahl der Natriumkanäle in der Plasmamembran [100], auf der anderen Seite bewirkt es eine Aktivitätssteigerung von bereits in der Membran vorhandenen Kanälen. Kuhnle et al. konnten zeigen, dass zwar K-Ras2-A, nicht jedoch K-Ras2-B durch Aldosteron reguliert werden.

Nicht ganz sicher ist allerdings, ob die jeweiligen Wirkungen von SGK1 und K-Ras2-A über die PI-3-Kinase miteinander verknüpft sind [78].

3. SNARE (soluble *N*-Ethylmaleimide-sensitive factor attachment-protein receptor), der zur Syntaxin-Maschinerie gehört, die ihre Funktion in der Insertion und anschließenden Entfernung von Vesikeln hat, die integrierte Membranproteine enthalten [121]. Syntaxin1-A scheint eine besondere Rolle bei der Regulierung des Natrium-Kanals zu spielen. Es ist neben anderen Isoformen, (Syntaxin3 und Syntaxin4), in der apikalen Membran von kultivierten epithelialen Zellen und in den Hauptzellen des cortikalen Sammelrohrs bei Ratten lokalisiert und wird dort wahrscheinlich zusammen mit ENaC co-exprimiert [130].

Die Isoformen 1-A und 3 erhöhen die Oberflächenexpression des Natriumkanals; Syntaxin1-A senkt zudem den messbaren Strom, während die Isoform 3 diesbezüglich keine Effekte zeigt [121].

4. CAP-1, das mit einem 987nt-ORF (= open reading frame) für ein Protein von 329 Aminosäuren codiert und durch Proteolyse eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit für in der Membran vorhandene Kanäle bewirkt [148].

Der Sequenzvergleich ergab Homologien zur Familie der Serin-Proteasen. Auch wurde eine signifikante Ähnlichkeit mit Kallikrein, Trypsin, TPA (tissue plasmin activator) und Urokinase festgestellt [149].

Bei CAP-Zugabe zeigt sich unter Versuchsbedingungen ein Anstieg des basalen Natriumstromes bei gleichzeitig sehr starker Abnahme der ENaC-Sensitivität für Trypsin.

In menschlichem Sperma wurde Prostasin entdeckt, ein Protein, das als das menschliche CAP-1-Äquivalent angesehen wird und wohl dieselben Wirkmechanismen aufweist.

- CFTR, ein multifunktionales Membranprotein, dessen Gen auf Chromosom 7q21-31 lokalisiert ist und für ein 1480-AS-Protein mit der Sequenz eines ABC-Transportproteins aus der großen Familie der ABC-Transporter [92] mit einem Molekulargewicht von 165 kDa codiert.

Expressiert wird CFTR in vielen verschiedenen Epithelien und hat dort unter anderem die Funktion eines spannungsunabhängigen Chloridkanals mit zwei Nucleotid-Bindungsdomänen (NBD1 und NBD2), die zur ENaC-Inhibition erforderlich sind [20].

Versuche zeigten, dass bei Co-Expression von ENaC und CFTR in Xenopus-Oozyten die Aufnahme von radioaktiv markiertem $^{22}\text{Na}^+$ durch die Aktivierung von CFTR reguliert wird, wobei der Effekt von der extrazellulären Cl^- -Konzentration abhängt [107].

Allerdings ist bis heute nicht klar, auf welche Weise ENaC und CFTR miteinander interagieren.

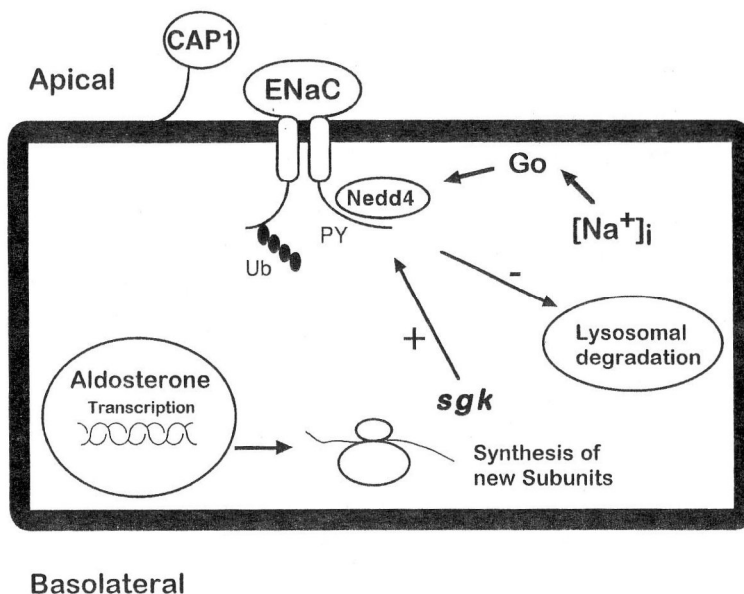


Abb. 10: Überblick über die Signalmechanismen in Mineralocorticoid-sensitiven Zellen
Aus: Alvarez de la Rosa 2000 [2]

2.5 Aufbau der α -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals (α ENaC)

2.5.1 Struktureller Aufbau und Lokalisation des α ENaC-Gens

Alle bisher bekannten Untereinheiten des epithelialen Natriumkanals besitzen untereinander eine signifikante Gleichheit, sowohl was ihre Aminosäuresequenz betrifft, als auch im Hinblick auf ihre jeweilige Domänenstruktur. Diese Gleichartigkeit besteht auch mit **Degenerine** genannten Proteinen, die bei der Bandwurmart *Cenorhabditis elegans* gefunden wurden und dort mechanosensorische Funktionen besitzen.

Zusammen mit einigen anderen Kanalproteinen bilden sie die Superfamilie der DEG/ENaC-Ionenkanäle, (s. Abb.6) [32].

Sowohl in der α -, als auch in der β -Untereinheit bindet Nedd4 an das C-terminale PY-Motiv des Kanals. Der Ubiquitinationszielort ist im N-Terminus lokalisiert [120].

In der α -Untereinheit existiert im N-terminalen zytosolischen Teil eine Region aus zehn Aminosäuren (Thr⁹² – Cys¹⁰¹) die das entscheidende Gly⁹⁵ enthält, das wichtig für die Schleusenfunktion des Kanals ist [150].

Die AS-Reste 2 – 67 der α -Subunit bei Ratten besitzen bestimmte Domänen im N-Ende, die eine kontrollierte Kanalaktivität ermöglichen [27].

2.5.2 Intronsequenzen der α -Untereinheit

Im menschlichen SCNN1A-Gen des epithelialen Natriumkanals (ENaC) existieren neben 13 Exons auch 10 Introns, deren Größe zwischen 105 bp und 6 kb variiert. Ludwig et al. gelang es 1998, sowohl die entsprechenden Basensequenzen aller Exons, als auch die der meisten Introns zu bestimmen [93]:

Dabei ließen sich die Introns **a**, **e-g** und **i-m** mit Hilfe der Routine-PCR darstellen, die restlichen (**b-d** und **h**) konnten nur durch LR-PCR (Long-Range -PCR) entschlüsselt werden.

Der Grund dafür ist zum einen, dass diese Introns sehr lang sind, (Intron **d** hat eine Größe von 6 kb), zum anderen, dass in den Introns **b**, **c** und **d** zum Teil sekundäre

Strukturen wie Alu-Sequenzen und $[GA]_6[A]_9$, $[TAT]$ und $[CATT]_8$ -Bereiche enthalten sind, weshalb sie sich mit Standardmethoden nicht sequenzieren lassen.

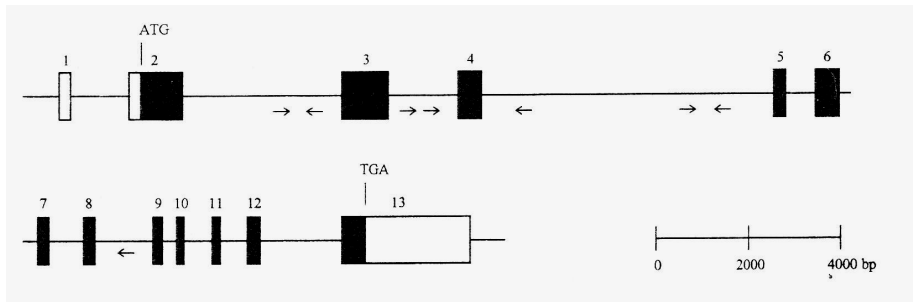


Abb. 11 Aufbau der α -Untereinheit
Aus: Ludwig, 1998

2.5.3 Genomische Organisation der α -Untereinheit

Der Startpunkt für die Translation liegt an Position NT 54-56 im Exon 2 und besteht aus der Nucleotidsequenz **ATG**. Daneben codiert das gesamte Exon 1 (45 bp) sowie die ersten 53 Basenpaare von Exon 2 für die nichttranslatierte Sequenz am 5'-Ende. Die transmembranären Regionen werden von Teilen von Exon 2 und 13 codiert, die restlichen Exons, (3-12), codieren alle für den Bereich der extrazellulären Schleife.

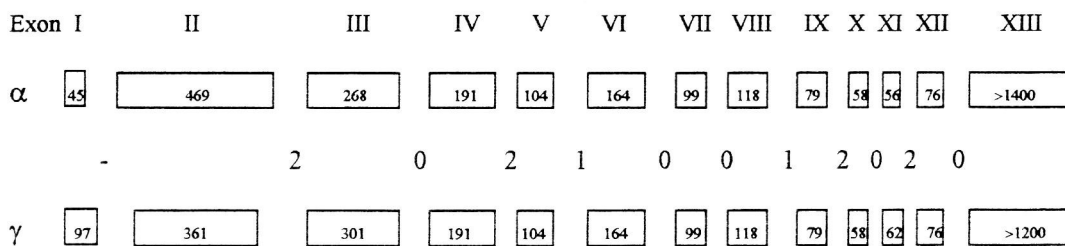


Abb. 12: Vergleich der α - mit der γ -Untereinheit des ENaC
Aus: Ludwig 1998

2.5.4 Struktur der 5'-Flankiersequenz

Der Cosmid-Klon D12S889, (ein doppelsträngiges DNA-Molekül mit einer Größe zwischen 20 und 50 kb), enthält die Basensequenzen der α -Untereinheit des ENaC, wie Baens et al. bereits 1995 feststellen konnten [9].

Da sowohl die untranslatierte Region am 3'-Ende als auch diejenige am 5'-Ende innerhalb des D12S889 dargestellt werden konnten, geht man davon aus, dass sich das gesamte ENaC-Gen in diesem Cosmid-Klon befindet.

Ludwig und seinen Mitarbeitern gelang es, 475 Basenpaare der Sequenz am 5'-Ende zu entschlüsseln, allerdings konnten sie weder TATA-, noch CCAAT-Wiederholungen, (sogenannte TATA-Boxen), in der betreffenden Region finden [93]. Ebenso wenig ließen sich im sequenzierten Gen Elemente darstellen, die die Wirkung von Aldosteron an Bestandteile oder Untereinheiten des Kanals weitervermitteln könnten. Das ist erstaunlich, weil der Natriumkanal durch dieses Hormon reguliert wird.

2.5.5 Polymorphismen in der α -Untereinheit des ENaC

Wie an vielen anderen Stellen im menschlichen Genom, existieren auch im Gen für den epithelialen Natriumkanal eine Reihe von Polymorphismen:

So findet man in der Alu-Sequenz der α -Untereinheit im Intron **d** an Position 52 eine Basenfolge, die einer Sequenz der Alu-Sp-Familie ähnelt und stark polymorph nicht nur in ihrem Poly-A-Schwanz ist [93].

An fünf verschiedenen Nucleotid-Positionen wurden genetische Variationen entdeckt und insgesamt konnten acht unterschiedliche Allele identifiziert werden [93].

Eine TAT-Trinucleotid-Wiederholungssequenz findet sich in Intron **c**; in Intron **d** existieren CATT-Tetranucleotid-Repeats, die allerdings in zehn getesteten Allelen keine Variation der Wiederholung zeigen.

Bisher sind zwanzig sogenannte „stumme“ Polymorphismen der für den epithelialen Natriumkanal codierenden Gene bekannt, die sich klinisch nicht bemerkbar machen und auch nicht mit Pseudohypoaldosteronismus assoziiert sind.

Dies sind in der α -Untereinheit:

1. in Exon 2 an Position 713 die Insertion eines Guanins im untranslatierten Bereich
2. in Intron **d** an Position 997 ein Basenaustausch T \rightarrow A
3. ebenfalls in Intron **d** ein G \rightarrow T-Austausch

-
4. oder eine Deletion an Position 1266 (Intron **d**)
 5. außerdem in Intron **d** die Insertion eines Thymins an Position 1657
 6. in Intron **e** eine Basendeletion (G) an Position 1926,
 7. ebenfalls in Intron **e** an Position 1990 ein Basenaustausch T → G,
 8. und in Exon 13 eine G → A-Transversion, die zu einem Alanin anstatt eines Threonins an Position 663 des Carboxyl-Endes der Aminosäuresequenz führt.

In der β -Untereinheit finden sich folgende Polymorphismen:

1. in Exon 6 ein G → C-Austausch an Position 1068, der einen Austausch von Glutamin zu Alanin an Position 314 des Proteins bewirkt
2. und in Exon 7 eine T → C-Transversion an Position 1174

In der γ -Untereinheit finden sich:

1. in Intron **a** ein G → C-Austausch
2. in Exon 2 eine G → A-Transversion an Position 164 im untranslatierten Bereich
3. ebenfalls in Exon 2 im untranslatierten Bereich die Deletion eines Adenins an Position 181
4. in Exon 6 ein C → T-Austausch an Position 1016, der zu einer veränderten Aminosäuresequenz, (Phenylalanin statt Serin), an Position 339 führt
5. ebenso in Exon 6 der Austausch eines Adenins gegen ein Guanin an Position 1048, der eine Aminosäurenänderung von Tyrosin nach Alanin an Position 350 bewirkt,
6. in Exon 7 eine C → A-Transversion an Position 1106 mit nachfolgendem Austausch eines Serins durch ein Tyrosin an Position 369
7. ebenfalls in Exon 7 der Ersatz eines Guanins durch ein Adenin an Position 1124, der zu einem Guanin → Asparaginsäure-Austausch führt,
8. in Exon 9 eine Transversion von G nach A an Position 1372 mit nachfolgendem Arginin → Serin-Austausch an Position 458 der Aminosäurekette
9. In Exon 13 zum einen ein Austausch von C nach T an Position 1596

10. zum anderen eine Transversion an Position 1599, (T → C), jeweils ohne entsprechende Auswirkungen auf die Proteinstruktur des Natriumkanals.

Untereinheit	Lokalisation im Gen	Art des Polymorphismus	Auswirkungen auf die Proteinstruktur
α	Exon 2, Position 713 (untranslatierter Bereich)	InsG	keine
α	Intron d, Position 997	T → A	keine
α	Intron d, Position 1266	G → T oder Del	keine
α	Intron d, Position 1657	InsT	keine
α	Intron e, Position 1926	DelG	keine
α	Intron e, Position 1990	T → G	keine
α	Exon 13, Position 663 (AS-Sequenz)	G → A	Alanin → Threonin, Position 663
β	Exon 6, Position 1068	G → C	Glutamin → Alanin, Position 314
β	Exon 7, Position 1174	T → C	keine
γ	Intron a	G → C	keine
γ	Exon 2, Position 164 (untranslatierter Bereich)	G → A	keine
γ	Exon 2, Position 181 (untranslatierter Bereich)	DelA	keine
γ	Exon 6, Position 1016	C → T	Serin → Phenylalanin, Position 339
γ	Exon 6, Position 1048	A → G	Tyrosin → Alanin, Position 350
γ	Exon 7, Position 1106	C → A	Serin → Tyrosin, Position 369
γ	Exon 7, Position 1124	G → A	Guanin → Asparaginsäure, Position 375
γ	Exon 9, Position 1372	G → A	Arginin → Serin, Position 458
γ	Exon 13, Position 1596	C → T	keine
γ	Exon 13, Position 1599	T → C	keine

Tab. 2: Polymorphismen in den Untereinheiten des ENaC und ihre Auswirkungen

Nach: Ludwig, 1998

3. Das Krankheitsbild des Pseudohypoaldosteronismus

3.1 Pseudohypoaldosteronismus Typ I

3.1.1 Definition

Pseudohypoaldosteronismus Typ I ist eine seltene nach den Mendel'schen Gesetzen vererbte Krankheit, die durch eine Resistenz der Endorgane (Niere bzw. andere epitheliale Gewebe) gegenüber Mineralocorticoiden gekennzeichnet ist.

Registriert ist der Pseudohypoaldosteronismus I im OMIM (online mendelian inheritance in man) unter den Nummern 177735 (dominant) und 264350 (rezessiv).

Der Name der Störung rührt daher, dass die Betroffenen alle Anzeichen eines Aldosteronmangels (Hypoaldosteronismus) zeigen, gleichzeitig aber die Blutserumwerte für Aldosteron teilweise exzessiv erhöht sind, ein Mangel an diesem Mineralocorticoid also in Wirklichkeit nicht vorliegt.

3.1.2 Vererbungsmodus

Die Krankheit kann auf zwei unterschiedliche Arten vererbt werden:

1. Autosomal rezessiv, was ein schweres Krankheitsbild hervorruft, und
 2. Autosomal dominant, was durch einen relativ milden Verlauf gekennzeichnet ist.
- Auf biochemischer Basis können diese zwei verschiedenen Formen allerdings nicht unterschieden werden.

Relativ typisch für die dominant vererbte Form ist ein symptomatischer Patient und verschiedene Familienmitglieder, die zwar biochemisch betroffen, klinisch aber asymptomatisch sind.

Von der rezessiv vererbten Form existieren wiederum zwei Unterformen, wobei die Eltern der Patienten heterozygote Träger des mutierten Gens und häufig mit einander verwandt sind.

Die autosomal rezessive Form des PHA I wird verursacht durch einen Defekt der α -, β -, oder γ -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals und hat schwerwiegende Natriumverluste über die Niere zur Folge.

In verschiedenen an betroffenen Familien durchgeführten Untersuchungen zeigte sich ein sehr heterogenes Krankheitsbild, mit jeweils ganz unterschiedlicher Ausprägung der Symptome, die von völlig symptomlosen Patienten bis zu einem tödlichen Krankheitsverlauf reichen [79].

Alle Patienten tragen die jeweilige Mutation in beiden Allelen der ENaC-Gene; meist handelt es sich um homozygot Kranke mit heterozygoten Eltern [129].

Jede der drei Kanal-Untereinheiten kann betroffen sein, die bisher bekannten Mutationen umfassen den Austausch von Einzelnucleotiden, Deletionen, Insertionen und Veränderungen an der Grenze zwischen Introns und Exons (Splicing-Stellen), sodass ein teilweise inaktiviertes oder komplett funktionsloses Protein die Folge ist. Außerdem sind vereinzelt Krankheitsfälle beschrieben worden, die sporadisch, ohne weitere betroffene Mitglieder in der Familie, aufgetreten sind.

Der Krankheitsverlauf ähnelt hier häufig demjenigen der dominanten Form [78].

3.1.2.1 Molekulargenetische Ursachen der rezessiven Form

Es wurden insgesamt sechzehn Mutationen beschrieben, die als Ursache der Krankheit in Frage kommen und auf zwei verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind:

1. Entweder ist das Chromosom 16 (16p 12.2-13.11) und die auf ihm liegenden Gene SCNN1B und SCNN1G betroffen, welche die β - und die γ -Untereinheit des Amilorid-sensitiven Natriumkanals kodieren, oder
2. das Chromosom 12 (12p 13.1-ter) und das auf ihm liegende Gen SCNN1A, das die α -Untereinheit des ENaC codiert.

Insgesamt wurden neun verschiedene Mutationen in der α -Untereinheit des ENaC gefunden, vier weitere in der β -Untereinheit und drei Mutationen, die die γ -Subunit des Natriumkanals betreffen [129].

ENaC-Subunit	Betroffenes Exon/Intron	Mutation	Codon-Veränderungen
α	Exon 2	256 C → T	Arg53stop
α	Exon 2	302delTC	Ile68fr
α	Exon 3	604delAC	Thr169fr
α	Exon 8	1404delC	Phe435fr
α	Exon 4	828delA	Ser243fr
α	Exon 8	1449delC	His450fr
α	Exon 8	1439insT	Tyr447fr
α	Exon 11	1621 C → T	Arg508stop
α	Exon 13	1784 C → T	Ser562Leu
β	Exon 2	236 G → A	Gly37Ser
β	Exon 3	647insA	Leu174fr
β	Exon 5	915delC	Ser263fr
β	Intron 12	1669 + 1 G → A	Abnormales Splicing
γ	Intron 2	318-1 G → A	Abnormales Splicing
γ	Intron 12	1570insGA	Abnormales Splicing
γ	Exon13	1627delG	Val543fr

Tab. 3: Bisher bekannte dem PHA-1 zu Grunde liegende Mutationen
Nach: Saxena 2002

Die jeweiligen homozygoten Regionen haben auf Chromosom 16 eine Größe zwischen 7 cM und 73 cM und beinhalten die Genloci D16S403, D16S412 und D16S417.

Auf Chromosom 12 finden sich homozygote Regionen mit einer Größe von < 4 cM bis 30 cM, welche die Genloci CD4, D12S374 und D12S889 beinhalten.

Als homozygote Region zwischen nicht verwandten Individuen findet sich auf Chromosom 16p im telomeren Locus der Genlocus D16S499 und der centromere

Locus D16S420 mit einer genetischen Distanz von 8 cM. Auf Chromosom 12 ist D12S93 der telomere Genlocus und D12S77 der centromere Locus, was einer genetischen Distanz von 10 cM entspricht.

Die der Krankheit zugrunde liegenden Mutationen sind in der α -Untereinheit des ENaC:

1. in Exon 2 eine Deletion zweier Basenpaare (TC) an Position 302, die zu einem Frameshift (Verschiebung des Leserasters) an Position 68 (Interleukin) der entsprechenden Aminosäuresequenz führt,
2. ebenfalls in Exon 2 ein Austausch von C nach T an Position 256, der zu einem prämaturnen Stopp des Proteins an Position 53 (Arginin) in der Aminosäurekette führt,
3. in Exon 3 die Deletion zweier Basenpaare (AC) an Position 604, die einen Frameshift an Position 169 (Threonin) in der Aminosäuresequenz bewirkt,
4. in Exon 4 der Verlust eines Adenins (Position 828), der an Position 243 (Serin) ebenfalls zu einem Frameshift im Protein führt,
5. in Exon 8 die Deletion eines Cytosins an Position 1404, was einen Frameshift an Position 435 (Phenylalanin) der Aminosäurekette zur Folge hat,
6. ebenfalls in Exon 8 die Insertion einer Base (T) an Position 1439, die ebenfalls eine Leserasterverschiebung bewirkt (Pos. 447, Tyrosin) und damit zu einem verstümmelten Kanal führt.
7. Als weitere Mutation in Exon 8 findet sich an Position 1449 der Verlust eines Cytosins mit daraus folgendem Frameshift an Position 450 (Histidin) des Proteins,
8. in Exon 11 der Austausch eines Cytosins gegen ein Thymin an Position 1621, der die Aminosäurekette bereits beim Arginin an Position 508 abbrechen lässt,
9. in Exon 13 ebenfalls ein C \rightarrow T-Austausch, der sich in einem Aminosäure-Austausch an Position 562 (Ser \rightarrow Leu) bemerkbar macht und die vorherrschende Mutation bei PHA Typ I in Schweden zu sein scheint [129]; [131].

Nicht ganz klar ist, ob die Mutationen Nummer 3 und Nummer 5 alleine den PHA auslösen können, oder nur, wenn sie in Kombination auftreten.

Die Mutation Nummer 1 betrifft das Codon 68 proximal der ersten Transmembran-Domäne des ENaC, die das codierte Protein dort unterbricht, das im Bereich der Aminosäuren 68 bis 144 keine Ähnlichkeit mehr mit dem normalen Protein zeigt, wo ein Stopp-Codon die Translation beendet [25].

Die Mutation Nummer 8 ist in einem CpG-Nucleotid lokalisiert, (entspricht der Position 1621 in der m-RNA-Sequenz X 76180), das häufig auch in anderen Genen Veränderungen zeigt [129].

Das betroffene Codon codiert eine Aminosäure im Bereich der extrazellulären Domäne des Kanals, der infolge der genetischen Veränderung nur eine Transmembran-Domäne und einen Teil der extrazellulären Schleife enthält, die zweite Transmembran-Domäne und den intrazellulären COOH-Terminus jedoch verloren hat [25].

In der β -Untereinheit wurden bisher nur drei verschiedene Mutationen gefunden:

1. in Exon 2 ein Basenaustausch an Position 236 (G \rightarrow A), der an Position 37 des Proteins einen Glycin \rightarrow Serin-Austausch zur Folge hat,
2. in Exon 3 die Insertion eines Alanins (Position 647), das zu einem Frameshift an Position 174 (Leucin) der Aminosäurekette führt,
3. in Exon 5 eine Basendeletion (Cytosin) an Position 915, die einen Frameshift an Position 263 (Serin) der Aminosäuresequenz nach sich zieht,
4. in Intron 12 einen G \rightarrow A-Austausch an Position 1669+1, der zu fehlerhaftem Splicing führt.

In der γ -Subunit wurden ebenfalls drei unterschiedliche Veränderungen identifiziert:

1. in Exon 13 ein G-Verlust an Position 1627, der einen Frameshift an Position 543 (Valin) des Proteins bewirkt,
2. in Intron 2 ein Basenaustausch (G \rightarrow A) an Position 318-1, der zu fehlerhaftem Splicing führt,

-
3. und in Intron 12 die Insertion eines Glycins und Alanins an Position 1570, was ebenfalls ein fehlerhaftes Splicing zur Folge hat.

Interessant ist, dass die meisten Mutationen in der α -Untereinheit des Natriumkanals gefunden werden, da sie die entscheidende Subunit für die physiologische Funktion des Kanals ist, allerdings keine einzige Veränderung im Bereich des COOH-Terminus lokalisiert ist [129].

Alle bisher bekannt gewordenen Patienten stammen aus consanguinen Familien (Familien unter Blutsverwandten), was dadurch zu erklären ist, dass die den PHA Typ I auslösenden Genveränderungen in der Allgemeinbevölkerung sehr selten sind, sodass die rezessive Form der Krankheit meist nur in bestimmten Familien übertragen wird und bisher noch nie spontan aufgetreten ist. (Die Fälle von sporadischem PHA, von denen berichtet wird, folgen einem dominanten Vererbungsmuster).

3.1.2.2 Molekulargenetische Ursachen der dominanten oder sporadischen Form

Das der dominant vererbten Form der Krankheit zugrunde liegende Gen ist nicht das für den epithelialen Natriumkanal, sondern das des Mineralocorticoid-Rezeptors (MR).

Das sind im Einzelnen das MLR-, das MCR- und das WR3C2-Gen [78].

Bei Patienten, deren Genotyp bestimmt wurde, konnten heterozygote Mutationen nachgewiesen werden, die einen Funktionsverlust des Mineralocorticoid-Rezeptors zur Folge haben, es liegt also eine Haploinsuffizienz vor, die bereits zur Ausbildung klinischer Symptome führt [78].

3.1.3 Klinisches Erscheinungsbild

1958 beschrieben Cheek und Perry erstmals das Krankheitsbild des auf die Niere beschränkten Pseudohypoaldosteronismus [26], der autosomal-dominant vererbt

wird. Seit 1979 ist eine weitere Form, der sogenannte **Multisystem-Pseudohypoaldosteronismus** bekannt, der ein rezessives Vererbungsmuster zeigt [110].

Kennzeichnend sind eine hyperkaliämische Azidose, ein signifikanter Natriumverlust über den Urin bei einer oft gleichzeitig bestehenden Hyponatriämie, und eine sehr hohe Plasma-Reninaktivität sowie extrem erhöhte Blutserumspiegel für Aldosteron. Meistens zeigen sich die ersten Krankheitssymptome im Neugeborenenalter oder während des ersten Lebensjahres der Betroffenen [23].

Fulminante Verläufe mit Dehydratation, Hyponatriämie, Hyperkaliämie, metabolischer Azidose, Gewichtsverlust, (manchmal sturzartig), und Gedeihstörungen, trotz einer normalen glomerulären Filtrationsrate und Nebennierenfunktion, sind häufig.

Wenn die Diagnose nicht rechtzeitig gestellt wird, ist ein letaler Ausgang nicht auszuschließen [25].

Während der Kindheit der Betroffenen treten gehäuft Infekte der oberen Luftwege auf; allerdings zeigt sich nicht das Bild des akuten respiratorischen Stresssyndroms [81], das bei α ENaC Knockout-Mäusen unter experimentellen Bedingungen hervorgerufen wird [25].

Die am häufigsten beobachteten Symptome der Krankheit sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Symptom	Beschriebenes Symptom/ bisher berichtete Fälle
Erstmanifestation mit Alter < 7 Monate	35/38
Männliches Geschlecht	22/38
Dokumentierter Na ⁺ -Verlust über den Urin	14/15
Dokumentierter Na ⁺ -Verlust über den Speichel	1/1
Dokumentierter Na ⁺ -Verlust über den Schweiß	1/6
Dokumentierter Na ⁺ -Verlust über den Stuhl	0/1
Erhöhtes Aldosteron im Urin	14/14
Erhöhtes Serumaldosteron	20/20

Erhöhte Aldosteron-Sekretionsrate	5/5
Erhöhtes Plasmarenin	16/16
Unauffällige Nierenbiopsie	4/4
Kein Ansprechen auf DOCA-Therapie	23/23
Kein Ansprechen auf Aldosteron i.v.	2/2
Ansprechen auf Natrium-reiche Diät	30/30
Normaler ACTH-Stimulationstest	13/13

Tab. 4: Häufig beobachtete Symptome des PHA I
Nach: Oberfield 1979

Bei der dominant vererbten Form, (s. unten), finden sich klassischerweise biochemisch zwar betroffene, klinisch aber beschwerdefreie Familienmitglieder, die die Krankheit an ihre Nachkommen weitervererben.

Die auf die Niere beschränkte Form zeigt eine mildere klinische Ausprägung der Symptome als der **Multisystem-PHA**, der auch andere Natrium-resorbierende Gewebe des Körpers betrifft und meistens durch ein schweres Krankheitsbild gekennzeichnet ist [78].

Familienstudien zeigten, dass sich in einigen Fällen, vor allem bei der dominant vererbten Form des Pseudohypoaldosteronismus, die Symptome der Patienten im Laufe der Kindheit und Jugend bessern, sodass häufig im Erwachsenenalter auf eine Nahrungsergänzung mit Kochsalz verzichtet werden kann [25].

Liegt die rezessive Variante der Störung vor, zeigt sich mit steigendem Lebensalter keine Verringerung des Salzverlustes; allerdings verschlimmern sich die Symptome im Vergleich zur Neonatalphase auch nicht, wenngleich die Gefahr lebensbedrohlicher Salzverlustkrisen in jedem Alter gegeben ist [78].

3.1.4 Pathogenese

Der Krankheit liegt eine Störung der Natrium-Resorption durch die Niere und anderer epithelialer Gewebe zugrunde, die auf einer Funktionseinschränkung des Amilorid-

sensitiven Natriumkanals (ENaC) oder des Mineralocorticoid-Rezeptors (MR) beruht, je nachdem, ob die rezessiv oder dominant vererbte Form des PHA vorliegt.

Die Folge ist ein Salzverlust, der zu einem intravasalen Volumenmangel führt, der wiederum eine verstärkte Freisetzung von Renin und nachfolgend Aldosteron bewirkt, um den Flüssigkeitsverlust des Körpers auszugleichen [25].

Da aber der epitheliale Natriumkanal in seiner Funktion stark eingeschränkt ist, kann die renale Kochsalzresorption nicht adäquat gesteigert werden, sodass der Volumenmangel bestehen bleibt.

Daneben treten eine Hyperkaliämie und eine metabolische Azidose auf. Diese Kalium- und Säureretention wird noch verstärkt durch eine Mangel durchblutung des Gewebes infolge der Hypovolämie [25].

3.1.5 Diagnosestellung

Renaler Salzverlust, gleichzeitig bestehende Hyperkaliämie und metabolische Azidose lassen einen Pseudohypoaldosteronismus Typ I vermuten, wenn man ein adrenogenitales Syndrom ausschließen kann. Zur Sicherung der Diagnose führt man einen Therapieversuch mit 0.1- 0.2 mg Fludrocortison über zwei bis drei Tage durch. Wenn die Patienten darauf nicht ansprechen, sondern die verstärkte Natriumausscheidung weiterhin unbeeinflusst bestehen bleibt, und wenn gleichzeitig die im Blut gemessene Plasmareninaktivität und die Aldosteronwerte stark bis extrem erhöht sind, gilt die Diagnose PHA als gesichert [75]; [76].

Bei jeder klinischen Manifestation des PHA I ist die Konzentration von Aldosteron und die Plasmareninaktivität [74] in Serum und Urin stark erhöht, das Serum-Natrium dagegen ist auf Grund des renalen Salzverlusts deutlich erniedrigt.

Zusätzlich besteht typischerweise eine schwere Hyperkaliämie und eine metabolische Azidose.

3.1.5.1 Laborchemische Diagnosemöglichkeiten des PHA

Als aussagekräftige diagnostische Methode gilt die Bestimmung folgender Laborwerte:

1. Die Messung des im **Urin** und **Serum** enthaltenen **Natriums** stellt den entscheidenden biochemischen Parameter zur Bestimmung renaler Salzverluste dar. Dazu ist in manchen Fällen die Gewinnung von 24h-Sammelurin nötig, meist aber ist eine Spontanurin-Probe ausreichend: Bei Patienten mit Hyponatriämie sollte der Urinwert für Na^+ ungefähr 0 sein, (Regulationsmaßnahme des Körpers, um einem weiteren Salzverlust entgegenzuwirken). Sind die Werte im Harn aber erhöht, ist damit der Natriumverlust über die Niere bewiesen. Die Bestimmung der quantitativen Ausscheidung über andere Körperflüssigkeiten wie Stuhl und Speichel ist mühsam, und es existieren keine Normwerte, sodass dies nur unter Forschungsbedingungen getestet wird [78].

2. **Plasmareninaktivität:**

Die Konzentration des in den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildeten Hormons Renin wird nur selten bestimmt, sondern häufiger seine Aktivität im Blut, wobei die Blutabnahme am besten morgens erfolgen sollte, und die Probe danach in gekühlten EDTA-beschichteten Röhrchen bei ungefähr 4° C bis zur Zentrifugation aufbewahrt wird, die ebenfalls bei 4° C durchgeführt werden muss.

Das abzentrifugierte Plasma muss bis zur weiteren Analyse eingefroren gelagert werden, dann wird es gewöhnlich bei 37° C inkubiert, und die Bildung von Angiotensin I aus endogenem Angiotensinogen mit Hilfe eines Radioimmunoassays bestimmt [78].

Die Plasmareninaktivität ist definiert durch die Menge des Angiotensin I in Nanogramm, die pro Milliliter Plasma pro Stunde entsteht, abzüglich des Angiotensin I, das schon vorher in der Blutprobe enthalten war.

Die **Normwerte** der PRA liegen bei 1-5 ng/ml/h, (entspricht 0.8-0.4 mmol/l/h), variieren aber je nach Alter, Natrium-Aufnahme und Position (liegend oder stehend) des Patienten.

Bei Neugeborenen sind Werte bis zu 10 ng/ml/h normal; die PRA sinkt mit zunehmendem Alter langsam ab, kann aber bis zum 5. Lebensjahr auch hohe Werte annehmen [78].

3. **Aldosteron** und seine Metabolite in Serum und Urin werden meist in

Radioimmunoassays mit Hilfe spezifischer Antikörper bestimmt.

Da die Konzentration dieses Mineralocorticoids nur 0.1% der Cortisol-Konzentration beträgt, ist zur exakten Messung ein Chromatographieverfahren (entweder Säulen- oder Papier-Chromatographie) notwendig.

Die **Normwerte** sind lageabhängig und variieren bei normalen Menschen mit regelrechter Salzzufuhr zwischen 40-250 pmol/l (1.5-10 ng/dl) im Liegen und 160-830 pmol/l (6-30 ng/dl) im Stehen.

Die Serumspiegel schwanken im Laufe des Tages: Die höchsten Werte finden sich morgens, die niedrigsten am Abend; sie folgen denen für Cortisol, ohne unter direkter Kontrolle von ACTH zu stehen, und steigen bei Lagewechsel vom Liegen in die aufrechte Position an.

Eine andere Möglichkeit, den Aldosteronspiegel zu bestimmen, besteht in der Messung mit einem sogenannten Gas-Chromatographie-Spektrometer (GC-MS) kombiniert mit der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC-MS). Da Aldosteron aber ein sehr instabiles Molekül ist, werden diese Methoden hauptsächlich in der Forschung angewendet.

Im Urin liegt das Mineralocorticoid vor allem in einer metabolisierten Form, dem Tetra-Hydro-Aldosteron (TH-Aldosteron) vor und wird so zusammen mit einem weiteren Metaboliten, dem Aldosteron-18-Glucuronid (Aldosteron-18-ER) ausgeschieden.

Die Werte für TH-Aldosteron lassen sich ebenfalls mit den Methoden des Radioimmunoassays mit spezifischen Antikörpern, sowie den beiden oben beschriebenen Chromatographie-Verfahren (GC-MS und HPLC-MS) im Urin bestimmen.

Die **Normwerte** sind unterschiedlich im Kindes- und Erwachsenenalter und liegen für Aldosteron-18-Glucuronid bei 1-8 µg/d für Kinder bis 10 Jahre und 3.5-17.5 µg/d für Erwachsene, und für freies Aldosteron bzw. TH-Aldosteron bei 0.1-0.4 µg/d bzw. 10-70 µg/d bei Erwachsenen [78].

4. Die Bestimmung von Aldosteron-Vorstufen im Blutplasma und im Urin wird mit Hilfe spezifischer Antikörper durchgeführt, wobei auch hier die Chromatographie angewendet wird, um die Spezifität der gemessenen Werte zu erhöhen.

Bei Vermutung eines Aldosteron-Synthese-Defekts werden die wichtigsten Aldosteron-Vorstufen bestimmt: Desoxycorticosteron (DOC), Corticosteron (B), 18-Hydroxy-Corticosteron (18-OH-B), und 18-Hydroxy-Desoxycorticosteron (18-OH-DOC).

Die **Normwerte** für Erwachsene liegen im Blutplasma bei 2-15 ng/dl für DOC, 0.1-0.52 µg/dl für Corticosteron, 17.5-100 ng/dl für 18-OH-B und 3.1-18 ng/dl für 18-OH-DOC [78].

Bei Kindern richtet sich die Höhe der jeweiligen Normalwerte nach dem Alter. Im Urin gelten Werte von 1.5-6.5 µg/d für 18-OH-B und 0.2-1.8µg/d für 18-OH-DOC als normal [78].

Nachdem die den PHA I verursachenden molekulargenetischen Veränderungen entdeckt worden waren, (s. unten), ist es mittlerweile möglich, ein Screening bereits während der Schwangerschaft durchzuführen, was hauptsächlich bei Frauen aus Familien, in denen die Störung bekannt ist, genutzt wird, für die Allgemeinbevölkerung aber wegen der extremen Seltenheit der Krankheit nicht relevant ist.

3.1.6 Therapie

Die Therapieführung des PHA I ist meistens relativ schwierig und muss den unterschiedlichen individuellen Parametern des Salzverlustes und der Elektrolytstörungen angepasst werden.

Im Säuglingsalter besteht sie vor allem aus der Gabe von hyperosmolaren Infusionslösungen ohne Zusatz von Kalium; manchmal werden auch Ionenaustauscherharze oder gegebenenfalls die Hämodialyse und eine Blutaustauschtransfusion zur Beseitigung der häufig bestehenden lebensbedrohlichen Hyperkaliämie eingesetzt [25].

Im weiteren Verlauf ist die therapeutisch wichtigste Maßnahme eine tägliche orale Natrium-Supplementation, sowie in Fällen schweren Salzverlustes und während Salzverlustkrisen eventuell auch Natriumbikarbonat und Resonium A[®], um eine bestehende metabolische Azidose zu beheben.

Die Menge des benötigten Salzersatzes muss dabei individuell empirisch bestimmt werden und wird im Krankenhaus unter stationärer Kontrolle der Serumelektrolyte ermittelt, zuhause meist an Hand von täglichen Gewichtskontrollen.

Dennoch schwankt dieser Bedarf zum Teil erheblich und kann rapide ansteigen, wenn die Patienten z.B. zusätzlich unter Infekten der oberen Luftwege oder des Magen-Darm-Trakts leiden.

Während einer akuten Dekompensation (Salzverlustkrise) können intravenös verabreichte Lösungen und Natriumbikarbonat i.v. nötig werden.

Die Behandlung mit Mineralocorticoiden hat keinen Einfluss auf die pathologische Natriumausscheidung oder das klinische Bild, kann aber als diagnostischer Test angewendet werden.

Eine Kausaltherapie gibt es bisher nicht.

3.1.7 Verlauf

Die Symptome des Salzverlustes bessern sich bei der rezessiven Krankheitsform mit zunehmendem Alter der Patienten nicht, sondern schwerwiegende NaCl-Verluste einschließlich Krisen, Schock oder Tod des Betroffenen können in jedem Alter auftreten [78].

Die dominant vererbte Variante ist nur während der Neonatalzeit gefährlich oder sogar lebensbedrohlich; gewöhnlich bessern sich die Symptome im Laufe der Kindheit, und es bleibt eine relativ milde Störung bestehen, die aber nicht therapiebedürftig ist.

Bei der dominant vererbten Variante der Krankheit ist der Salzverlust auf die Niere beschränkt und betrifft keine weiteren Organe, (Darm, Lunge oder Schweißdrüsen).

Die Symptome bessern sich mit zunehmendem Alter der Patienten, sodass eine weitere medikamentöse Therapie meist überflüssig wird.

Allerdings gibt es keinen einzigen Bericht über eine komplette Remission, und Normwerte der PRA oder des Serumaldosterons werden meistens nur unter stationär kontrollierter Infusionstherapie erreicht.

Liegt ein sporadisch aufgetretener Pseudohypoaldosteronismus vor, zeigen die Betroffenen häufig zusätzliche klinische und biochemische Befunde, die in den familiären Formen nicht auftreten, wie z.B. eine Hyperprostaglandinämie, eine positive Reaktion auf Indomethazin oder auch ein Polyhydramnion in utero, das mit

einer erhöhten Frühgeburtlichkeit verbunden sein kann; außerdem beobachtet man Hyperkalziurie und gelegentlich Nieren- und/oder Gallensteine [76].

3.2 Pseudohypoaldosteronismus Typ II

Diese Krankheit ist auch unter dem Namen **Gordon's Syndrom** bekannt, wurde im Jahr 1986 erstmals beschrieben [55] und ist im OMIM unter der Nummer 114300 verzeichnet.

Das klinische Erscheinungsbild unterscheidet sich stark von demjenigen des PHA I, es wird aber dennoch vermutet, dass die Pathogenese dieser Störung ebenfalls auf einem Defekt bestimmter Ionenkanäle in der Niere beruht.

Betroffen sind sowohl Jugendliche als auch Erwachsene; als Hauptsymptome treten Hyperkaliämie, hyperchlorämische Azidose, erniedrigte oder normale Renin- und Aldosteronspiegel im Blut, Hypertonie und Kleinwuchs auf, was die Krankheit als Pseudohypoaldosteronismus Typ II klassifiziert.

Die Nierenfunktion scheint bis auf eine gesteigerte Chlorid-Resorption im Tubulussystem bei den Patienten nicht beeinträchtigt zu sein; es wird vermutet, dass die Thiazid-sensitiven Segmente im Nephron verändert sind, was zu einer verminderten Natrium-Ausscheidung und Kalium-Sekretion führt, und anschließend die Retention von Natrium zur Folge hat. Daraus lassen sich die weiteren Symptome wie die Hypertonie und die verminderten Blutwerte für Renin und Aldosteron erklären.

Eine wirksame Therapie stellt Hydrochlorothiazid dar.

Da die Krankheit gehäuft in Familien auftritt, wird eine genetische Ursache vermutet, und die meisten bisher bekannten Fälle sind mit einem autosomal dominanten Vererbungsmuster vereinbar. Allerdings wurde noch kein bestimmtes Gen entdeckt, das als Ursache der Störung in Frage kommt, aber durch Linkage-Analysen bei betroffenen Familien wurden mindestens drei verschiedenen Genloci gefunden (WNK 1,9), die damit in Zusammenhang stehen könnten, sodass man von einem heterogenen Vererbungsmuster der Krankheit ausgeht [99]; [35].

Daneben wird von sporadisch aufgetretenen Fällen berichtet [76].

3.3 Pseudohypoaldosteronismus Typ III (Transienter Pseudohypoaldosteronismus)

Sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen kann eine Reihe urosystemischer Erkrankungen wie obstruktive Uropathie, durch Blei verursachte und Sichelzell-Nephropathie, Amyloidose sowie Infektionen des Harntrakts mit einer weiteren Form des PHA assoziiert sein, die als transienter oder reversibler Pseudohypoaldosteronismus bekannt ist und sich in einer vorübergehenden Mineralocorticoid-Resistenz äußert [75]. Nach Resektionen des Ileums und Kolons lassen sich manchmal ebenfalls renale Salzverluste beobachten, die diesem Krankheitsbild entsprechen [78].

Die klinischen Symptome sind die gleichen wie beim hereditären PHA I: Stark erhöhte Plasma-Renin- und Aldosteronwerte, stark erniedrigtes Serum-Natrium, Salzverlust über die Niere und eine hyperkaliämische Azidose.

Der radiologische Nachweis einer Veränderung im Bereich des Harntrakts und/oder Zeichen einer Infektion sind in diesem Fall wegweisend für die Diagnosestellung. Wie auch bei der erblichen Form können exogen zugeführte Mineralocorticoide die metabolische Entgleisung nicht beheben, allerdings bewirkt die Beseitigung der bestehenden renalen Funktionsstörung eine komplette Heilung und führt zur Korrektur der biochemischen und klinischen Veränderungen, was gewöhnlich durch ein operatives Vorgehen erreicht werden kann [78].

Als Krankheitsursache vermutet man im Blut zirkulierende humorale Faktoren [77], da bisher keine genetische Komponente bekannt und außerdem sehr unwahrscheinlich ist, weil auch unilaterale Nierenfunktionsstörungen das Syndrom hervorrufen können.

Neuere Studien gaben Hinweise darauf, dass inflammatorische Zytokine wie TGF β oder Interleukin-1 als krankheitsauslösende Mediatoren wirken könnten [144].

4. Krankengeschichte der Indexpatienten

Auf Grund massiver renaler Salzverluste trotz erhöhter Plasmareninaktivität und Serumaldosteronwerte wurde bei unseren Indexpatienten M.P. und B.P. die

Diagnose „Pseudohypoaldosteronismus“ gestellt. Genetischer Hintergrund der Erkrankung ist die Verwandtschaft ersten Grades der Eltern, die Überträger sind. Beide Kinder waren phänotypisch unauffällig und wurden, obwohl Frühgeburtlichkeit im Zusammenhang mit der Krankheit nicht selten vorkommt, etwa am errechneten Geburtstermin geboren.

Im Laufe ihrer Kindheit und Jugend kam es immer wieder zu Salzverlustkrisen, manchmal ohne jeglichen erkennbaren Grund, die nur durch Infusionstherapie mit hyperosmolaren Kochsalzlösungen beherrschbar waren, auf die die Kinder aber regelmäßig innerhalb von zwölf Stunden gut ansprachen.

Die Entwicklung der beiden Patienten verlief normal; die Werte für Körpergewicht und Größe lagen sämtlich auf der fünfzigsten Perzentile, und auch die geistigen und psychischen Fähigkeiten waren während der Kindheit altersentsprechend [23].

Dies ist erstaunlich, weil eine chronisch negative Salzbilanz, die hier ebenfalls vorlag, (da Normwerte der Elektrolyte im Blut nur unter Infusionstherapie erreicht werden konnten), erwiesenermaßen meistens Minderwuchs und Gedeihstörungen verursacht [80]; [125].

4.1 Fallbeschreibung, Therapie und Verlauf beim Mädchen, (M.P.)

Das ältere Kind erlitt bereits im Alter von fünf Tagen eine schwere Salzverlustkrise mit Schock, Bradykardie und Schnappatmung. Biochemisch lagen Hyponatriämie, Hyperkaliämie und eine metabolische Azidose vor [23].

Die Verdachtsdiagnose „Adrenogenitales Syndrom mit Salzverlust“ musste verworfen werden, als zugeführte Steroide keine Wirkung zeigten, sondern die Serum-Elektrolyte sich erst unter hochdosierter Gabe von Kochsalz, (anfangs als hyperosmolare Infusionslösung, später oral), und Natriumbikarbonat normalisierten.

Die Menge des benötigten Natriums wurde im Krankenhaus durch regelmäßige Messung der Serum-Elektrolyte bestimmt. Während der ersten Lebensjahre der Patienten schätzten die Eltern sie über zweimal täglich durchgeführte Gewichtskontrollen ab, und heute wird sie über das Abwiegen der Nahrung bzw. je nach aufgenommener Flüssigkeitsmenge kalkuliert.

Dabei stellte sich im Lauf der Zeit heraus, dass der Bedarf an zugeführtem Kochsalz bei 1.0-1.25 g (43.5 – 54.4 mmol) Natrium pro 100 g Flüssigkeit oder Nahrung (außer Brot) liegt [23].

Die Therapie gestaltete sich beim Mädchen während des ersten Lebenshalbjahres relativ schwierig; es kam immer wieder zu Erbrechen, trotz Ausgleichs des Salzverlustes (ca. 60-70 mmol Na⁺/d) durch hochdosierte NaCl-Zufuhr (175 mmol/d bzw. 47 mmol/kg/d). Interessanterweise lag dieser Salzverlust nachts nur wenig unter demjenigen tagsüber, obwohl die Kochsalzzufuhr nachts deutlich geringer ist, was eine geringere Salzausscheidung in der Nacht erwarten ließe. Außerdem kamen Schwankungen des Körpergewichts und der Serum-Natriumwerte und manchmal sogar Salzverlustkrisen mit Schocksymptomatik vor [23].

In der zweiten Hälfte des ersten Lebensjahres trat eine gewisse Stabilisierung ein, die durch regelmäßige vierstündliche Ernährung auch während der Nachtstunden mit Zusetzen der jeweils benötigten Kochsalzmenge sowie Natriumbikarbonat und Resonium A[®] (Polysulfonsäure mit Natriumsalz zu einem Kationenaustauscher quervernetzt zur Therapie der Hyperkalziämie) aufrechterhalten werden konnte. Heute werden Natriumbikarbonat und Resonium A[®] nur noch während Salzverlustkrisen bei Bedarf gegeben.

Im Jugendalter erlitt das Mädchen eine weitere sehr schwere Salzverlustkrise mit massiver Hyperkaliämie, in deren Verlauf es, als die Patientin bereits in die Kinderklinik gebracht worden war, zu einem Herzstillstand kam, und das Mädchen somit reanimiert wurde.

Wie die Mutter uns berichtete, sei sie seitdem etwas verlangsamt, und ihr Intellekt sei leicht beeinträchtigt.

4.2 Fallbeschreibung, Therapie und Verlauf beim Jungen, (B.P.)

Das jüngere der Kinder, ein Junge, wurde vom ersten Lebenstag an überwacht und zeigte am sechsten Lebenstag erstmalig Hyponatriämie bei gleichzeitig bestehender Hyperkaliämie, aber nur geringe Anzeichen einer Dehydratation.

Insgesamt sind bei ihm die Symptome weniger gravierend als bei seiner Schwester, und der Salzbedarf ist geringer [23].

Die Diagnose „Pseudohypoaldosteronismus“ konnte im Alter von zwei Monaten bestätigt werden, als während einer akuten Salzverlustkrise neben den in spezifischer Weise veränderten Serum-Elektrolyten erstmals auch eine erhöhte Plasminogenaktivität sowie deutlich erhöhte Aldosteronwerte im Blut gemessen wurden.

Im Laufe seiner Kindheit und Jugend erlitt der Junge ebenso wie seine ältere Schwester häufig Salzverlustkrisen, die oft nur durch banale Infekte des Respirationstrakts getriggert wurden [23], jedoch meistens einen stationären Aufenthalt im Krankenhaus erforderlich machten.

Mit Hilfe hochkonzentrierter natriumhaltiger Infusionslösungen ohne Kaliumzusatz und bei schwerem Verlauf der Krise zusätzlicher Gabe von Resonium A[®] gelang es aber, die Serum-Elektrolyte jeweils innerhalb eines Tages zu normalisieren und eine deutliche Besserung der klinischen Symptome zu erreichen.

Es bleibt ungeklärt, wieso der Junge einen milderen Krankheitsverlauf zeigte.

4.3 Genaue Lokalisation der Genveränderung bei den Indexpatienten

Als Krankheitsursache der rezessiv vererbten Form des Pseudohypoaldosteronismus Typ I sind eine Reihe von Mutationen im Gen des epithelialen Natriumkanals (ENaC) beschrieben worden, (s. Kapitel 3.1.2.1).

Bei unseren Indexpatienten handelt es sich um eine Mutation in der α -Untereinheit des Kanals.

Wie Untersuchungen von Dr. David Geller ergaben, der den in Philadelphia, USA, lebenden Teil der Familie P. medizinisch betreut, liegt die entscheidende Veränderung in Exon 3 des betreffenden Gens (SCNN1A) [unveröffentlichte Daten]. Diese krankheitsverursachende Mutation war davor noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Die Genveränderung besteht aus der Insertion eines Guanidins zwischen Position 1856 und 1857 der Basensequenz, (s. Abb. 13).

Dies führt zur Funktionslosigkeit des codierten Proteins, der α -Untereinheit des Ionenkanals, und in der Folge zur Ausbildung eines die Natrium sezernierenden Epithelien betreffenden Salzverlustsyndroms, wie es auch bei der Familie P. in zwei Fällen aufgetreten ist.

GCCTTNGGTACCGGAATTAAGAGGAGCTGGAGGAGCTGGACCG
CATCACAGAGCAGACGCTCTTTGACCTGTACAAATAC
AGTCCTTCACCACTCTCGTGGCCGGCTCCCGCAGCCGTCG
CGACCTGCGGGGGACTCTGCCGCACCCCTTGCAGCGCCT
GAGGGTCCCGCCCCCGCCTCACGGGG*G*CCCGTCGAGCCC
GTAGCGTGGCCTCCAGCTTGCGGGACAACAACCCCCAGGGG
GGACTGGAAGGA

Abb. 13: Ausschnitt aus der Basensequenz von Exon 3. Das *G* entspricht der Mutation im Genom der Indexpatienten, (Insertion G an Position hαENaC1856).

III. EXPERIMENTELLER TEIL

5. Beschreibung der verwendeten Techniken und Materialien

5.1 Grundzüge der PCR (Polymerase Chain Reaction)

5.1.1 Prinzip der PCR

Das Prinzip der PCR besteht in der Vervielfältigung eines kurzen DNA-Abschnitts durch eine DNA-Polymerase, womit eine selektive Amplifikation der genetischen Information dieses Abschnittes ermöglicht wird.

Die Voraussetzung hierfür ist, dass die Basen-Sequenzen beider Enden des zu amplifizierenden Stückes bekannt sind.

An jedem dieser Enden muss ein spezifischer Primer (= kurze Oligonucleotide) mit der DNA hybridisieren.

Als „Vervielfältigungs-Enzym“ wird meist die thermostabile Polymerase I des Organismus *Thermus aquaticus* verwendet, der in heißen Quellen vorkommt. Auf Grund ihrer Hitzestabilität wird sie auch bei hohen Temperaturen von bis zu 95° C nicht denaturiert.

Die einzelnen Schritte der PCR sollen im Folgenden kurz dargestellt werden:

1. Die zu untersuchende DNA-Matrize muss mit Primern versehen werden.
2. Man fügt dem Ansatz Taq-Polymerase zu und inkubiert, um dadurch die Bildung neuer Komplementärstränge der ursprünglichen DNA, die als Vorlage dient, zu fördern.
3. Zum Lösen der neu gebildeten Stränge von der Matrize wird der Reaktionsansatz auf 94° C erhitzt, was auch als **Denaturierung** bezeichnet wird.
4. Das Gemisch wird wieder abgekühlt, um eine erneute Hybridisierung der Primer mit den DNA-Strängen, (und zwar auch mit den neu synthetisierten), zu ermöglichen.

-
5. Daran schließt sich der zweite Zyklus der DNA-Synthese mit Hilfe der Taq-Polymerase an.
 6. Insgesamt führt man 25-30 Wiederholungen der Denaturierung, Hybridisierung und Synthetisierung durch und erhält auf diese Weise das amplifizierte DNA-Fragment in mehrere-hundert-Millionen-facher Anzahl.
 7. Damit ist die eigentliche PCR abgeschlossen; allerdings müssen die PCR-Produkte auf Vollständigkeit und Korrektheit kontrolliert und danach gereinigt werden. Zu diesem Zweck analysiert man eine Probe des Reaktionsansatzes durch Agarose-Gelelektrophorese: Nach Färbung mit Ethidiumbromid zeigt sich idealerweise eine Bande im Gel, die dem vervielfältigten DNA-Fragment entspricht.

Alternative Analyse-Methoden umfassen die Ligierung der PCR-Produkte mit einem Plasmid- oder Phagenvektor und eine anschließende Klonierung und Sequenzierung [21].

5.1.2 Ermittlung der richtigen Reaktionstemperatur

In jedem Zyklus der PCR tritt ein Wechsel zwischen drei unterschiedlichen Temperaturwerten auf:

1. Denaturierungstemperatur:

Meist liegt sie bei 94° C, die nötig sind, um die Bildung von DNA-Einzelsträngen durch Aufbrechen der Basenpaarungen zu erreichen. Dadurch entstehen die Matrizen für den nächsten Zyklus.

2. Hybridisierungstemperatur:

Sie ist deutlich niedriger als die Denaturierungstemperatur; hier geschieht das Anheften der Primer an die Matrize.

3. Synthesetemperatur:

Meistens beträgt sie 74° C und liegt damit knapp unterhalb des Temperatur-Optimums der Taq-Polymerase.

Am entscheidensten für das Gelingen der Reaktion ist die Hybridisierungstemperatur, da sich die Primer nicht mit der DNA verbinden, wenn die Temperatur zu hoch ist, andererseits Fehlpaarungen nicht zusammenpassender Basen bei zu niedrigen Temperaturen stabil sind, was zu Ungenauigkeiten des amplifizierten DNA-Fragments führt.

Das Abschätzen der optimalen Hybridisierungstemperatur erfolgt nach einer bestimmten Formel [21] und liegt 1-2° C unterhalb der Schmelztemperatur (T_m) des Primer-DNA-Hybrids, bei der die beiden Komponenten Primer und DNA dissoziieren.

5.1.3 Analyse der PCR-Produkte

Zur Auswertung der Produkte im Anschluss an die PCR haben sich 3 unterschiedliche Verfahren durchgesetzt: Die Gelelektrophorese, die Klonierung und die Sequenzierung der amplifizierten DNA, (s. Kapitel 5.3).

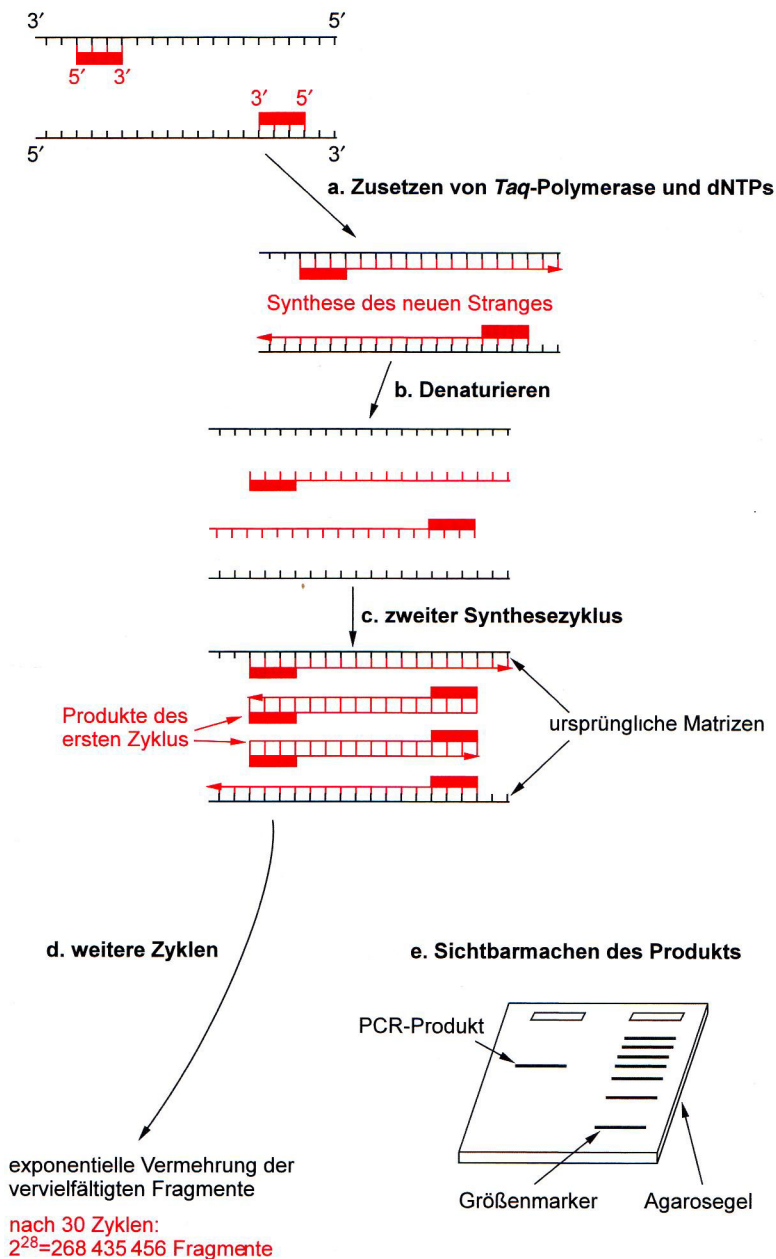


Abb. 14: Schematische Darstellung der PCR-Technik

Aus: Gentechnologie für Einsteiger

5.2 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

Hierbei handelt es sich um eine Makrofragmentmuster-Analyse genomischer DNA, bei der zuerst die DNA aus weißen Blutzellen oder EDTA-Blut (z.B. eines vermutlich an einer Erbkrankheit leidenden Patienten) isoliert werden und dann in Agarosegel-Blöckchen überführt werden muss.

Daraufhin erhält man reine, ungescherte DNA, die durch ein selten schneidendes Restriktionsenzym (z.B. EcoRI) verdaut wird.

Die Trennung der „Verdauungsprodukte“, d.h. der einzelnen Fragmente, nach ihrer Länge erfolgt mit Hilfe der sogenannten Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) im Contoured Clamped Homogenous Electric Field (CHEF).

Bevor man sie im Gel unter Anregung mit UV-Licht visualisieren kann, muss man die Fragmente mit Ethidiumbromid anfärben, um das Fragmentmuster der untersuchten DNA dokumentieren (z.B. fotografieren) zu können.

Dadurch stehen sie zum Vergleich mit dem Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus der DNA einer „Normalperson“ zur Verfügung.

5.3 Grundzüge der DNA-Sequenzierung

5.3.1 Beschreibung der unterschiedlichen Methoden

Es gibt zwei verschiedene Methoden, die Basensequenz eines bestimmten DNA-Stückes zu entschlüsseln:

1. Die Sanger-Coulson-Methode und
2. die Maxam-Gilbert-Methode.

Für die Anwendung der Sanger-Coulson-Methode benötigt man einzelsträngige DNA, die in einen Vektor rekombiniert wurde und im ersten Schritt der PCR mit einem Oligonucleotid-Primer hybridisieren muss.

Dieser Primer stellt den Startpunkt für die Synthese des komplementären DNA-Stranges dar, die mit Hilfe der DNA-Polymerase I oder eines ähnlichen Enzyms (z.B. der Sequenase) durchgeführt wird.

Zur Strangsynthese versetzt man den Primer und die DNA mit der Polymerase und 4 verschiedenen Desoxynucleotiden (dNTPs).

Außerdem fügt man dem Reaktionsansatz ein weiteres, abgewandeltes, Nucleotid hinzu, ein sogenanntes Didesoxynucleotid (ddNTP), das genauso wie die anderen Nucleotide in die entstehende DNA eingebaut wird. Da es als Didesoxynucleotid eine Hydroxylgruppe weniger besitzt, die zur Anheftung anderer NTPs nötig ist, wird die

weitere Synthese des Stranges durch Kettenabbruch verhindert. Zur Markierung des neu synthetisierten Stranges setzt man neben den „normalen“, unbehandelten dNTPs einige radioaktiv markierte Desoxynucleotide (^{35}S -dNTP oder ^{32}P -dNTP) zu, wodurch die spätere Analyse der DNA ermöglicht wird.

Das Konzentrationsverhältnis zwischen Desoxy- und Didesoxynucleotiden wird so gewählt, dass jeder Strang relativ weit synthetisiert werden kann, bevor ein ddNTP eingebaut wird und den Abbruch der neu entstehenden Nucleotid-Kette auslöst. Dadurch erhält man sehr viele, unterschiedlich lange DNA-Stränge, die alle mit einem Didesoxynucleotid enden.

Die Strangsynthesereaktion lässt man viermal parallel mit einem jeweils anderen Didesoxynucleotid ablaufen und erhält auf diese Weise vier verschiedene Arten neu synthetisierter Polynucleotid-Stränge, die alle auf dem jeweiligen ddNTP (A, T, G oder C) enden.

Als nächster Schritt schließt sich meist die Gelelektrophorese an, durch die eine Trennung von Strängen möglich ist, die sich in ihrer Länge nur um ein einziges Nucleotid unterscheiden.

Dazu verwendet man sehr dünne Polyacrylamid-Gele mit einer Dicke von weniger als 0,5 mm. Sie enthalten Harnstoff, der die DNA denaturiert und zur Abtrennung der neu synthetisierten Stränge von der ursprünglichen DNA-Matrize führt.

Um sicherzustellen, dass die Einzelstränge nicht re-naturieren, muss die Gelelektrophorese unter Hochspannung und bei Temperaturen von mindestens 60°C ablaufen.

Sichtbar gemacht werden kann die DNA danach durch Autoradiographie, mit Hilfe der radioaktiv markierten Didesoxynucleotide, (s. oben).

Das Ablesen der gesuchten DNA-Sequenz geschieht durch die Position der jeweiligen Banden im Elektrophorese-Gel:

Diejenige Bande, die im Gel am weitesten gewandert ist, repräsentiert das kürzeste DNA-Stück.

Durch Identifizierung der Spur, in der die Bande sichtbar wird, (A-, T-, G- oder C-Spur), erhält man das erste Nucleotid der gesuchten Sequenz und auf die gleiche Weise auch die restlichen Nucleotide.

Nun liest man die Spuren über die Gesamtlänge des Autoradiogramms der Reihe nach ab, bis die einzelnen Banden so dicht liegen, dass man sie nicht mehr unterscheiden kann.

Auf diese Weise lassen sich Sequenzen von bis zu 400 Nucleotiden bestimmen [21].

Für die Maxam-Gilbert-Methode der DNA-Sequenzierung verwendet man doppelsträngige DNA-Fragmente, d.h. es wird kein Primer benötigt, da nicht ein neuer DNA-Strang aufgebaut, sondern ein bereits vorhandener Strang mit Hilfe spezifischer Chemikalien gespalten wird.

Es existieren mehrere Varianten der Methode, die sich untereinander nur geringfügig unterscheiden [21].

Bei der heutzutage hauptsächlich verwendeten Version muss im ersten Schritt die zu sequenzierende DNA an beiden 5'-Enden der Stränge mit radioaktivem Phosphor markiert werden. Daraufhin wird DMSO (Dimethylsulfoxid) zugegeben und die Probe auf 90° C erhitzt, wodurch die Basenpaarungen des Doppelstrangs aufbrechen und eine Dissoziation in DNA-Einzelstränge erreicht wird.

Die Trennung dieser Einzelstränge erfolgt durch Gelelektrophorese; anschließend wird der Strang gereinigt und auf vier verschiedene Ansätze aufgeteilt, die jeweils mit einem der Spaltungsreagenzien behandelt werden. Auf diese Weise werden die Nucleotide einer für die jeweilige Spaltungschemikalie spezifischen Modifikation unterzogen, durch welche die Stränge an den entsprechenden Basen für die Spaltung in Einzelstränge zugänglich werden, wenn man zusätzlich Piperidin zugibt, das DNA-Moleküle an methylierten Nucleotiden spalten kann [21].

In jedem Strang erfolgt nur eine einzige Spaltung, wobei einige der gespaltenen Fragmente ihre ³²P-Markierung am 5'-Ende behalten, was nach erneuter Elektrophorese hilfreich für das Ablesen der Nucleotid-Sequenz im Autoradiogramm ist, weil man so die Banden erkennen kann, die diese markierten Fragmente repräsentieren.

5.3.2 Sequenzierung von PCR-Produkten

Bevor man PCR-Produkte sequenzieren konnte, musste man früher erst eine Klonierung durchführen, wobei häufig das Problem der Ungenauigkeit in der klonierten DNA-Sequenz durch Fehler der Taq-Polymerase auftrat. Deshalb wurde die Methode dahingehend weiterentwickelt, dass heutzutage eine direkte Sequenzierung von PCR-Produkten ohne vorangehende Klonierung möglich ist:

Diese beruht auf der Sanger-Methode, d.h. man verwendet einzelsträngige DNA. Dafür müssen die doppelsträngigen PCR-Produkte vor der Weiterverarbeitung zuerst gereinigt werden: Man gibt dem Reaktionsansatz einen modifizierten PCR-Primer zu, mit dessen Hilfe man die an ihm synthetisierten DNA-Stränge leicht reinigen kann. Als modifizierter PCR-Primer werden z.B. Primer verwendet, die magnetische Perlen enthalten, oder solche, die mit Biotin markiert sind, wodurch ebenfalls eine einfach durchzuführende Reinigung möglich ist.

Die anschließende weitere Prozedur der Sequenzierung ist der Sanger-Methode sehr ähnlich; Unterschiede bestehen nur darin, dass der Ausgangspunkt für die Sequenzierung einer der ursprünglichen PCR-Primer ist, der komplementär zum gereinigten DNA-Strang sein muss.

5.3.3 Zyklische Sequenzierung

Diese Methode ist sehr zeitsparend, weil hier die PCR und die Sequenzierung in einem einzigen Reaktionsschritt ablaufen.

Allerdings wird nur ein Primer zugesetzt, d.h. es wird auch nur ein Strang der DNA-Matrize kopiert, dies aber gleich sehr viele Male, da die Reaktion in einem Temperatur-Kreislauf zyklisch abläuft.

Die eigentliche Sequenzierreaktion vollzieht sich in vier Parallel-Ansätzen mit jeweils einem anderen Didesoxynucleotid, wodurch man die DNA-Sequenz dann wie bei den anderen Methoden in der Gelelektrophorese ablesen kann.

5.3.4 Automatische Sequenzierung

Die Ermittlung der gesuchten DNA-Sequenz erfolgt bei dieser Methode mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern, die an die dem Reaktionsansatz zugefügten Didesoxynucleotide für die Kettenverlängerung gekoppelt sind. Auf diese Weise trägt jede an einem ddNTP abgebrochene Kette eine der vier möglichen fluoreszierenden Markierungen.

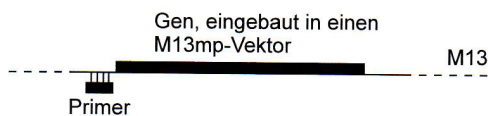
Verwendet man für jedes Didesoxynucleotid einen anderen Farbstoff, hat das den Vorteil, dass nicht mehr vier verschiedenen Reaktionsansätze nötig sind, sondern ein einziger ausreicht, da man die unterschiedlichen Basen, (A, T, G, C), an den

Kettenenden durch die unterschiedliche Farbgebung der Fluoreszenzmarker erkennen kann.

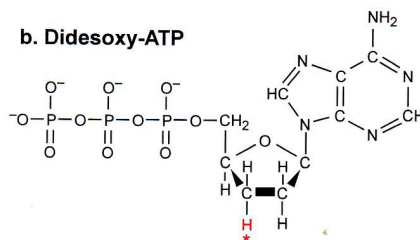
Der Nachweis der Farbstoffe und die Auswertung bzw. das Ablesen der DNA-Sequenz erfolgt mit Hilfe eines Computers: Man lässt die Reaktionsprodukte an einem Detektor vorbeilaufen, nachdem man sie in eine Vertiefung in einem Polyacrylamidgel oder in ein Röhrchen eines Kapillar-Elektrophorese-Systems überführt hat. Im Vergleich zu den herkömmlichen Sequenzierverfahren erreicht man so eine erhebliche Material- und Kostenersparnis.

Der Detektor kann die einzelnen Banden an Hand der von ihnen ausgehenden unterschiedlichen Fluoreszenz-Signale erkennen; der Computer „übersetzt“ die vom Detektor übermittelten Daten in die zugehörige DNA-Sequenz [21].

a. Anhybridisieren des Primers



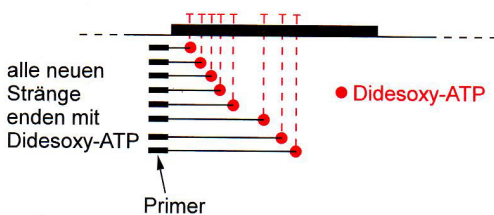
b. Dideoxy-ATP



DNA-Polymerase
dATP, dTTP,
dGTP, dCTP,
Dideoxy-ATP

* Position, an der die OH-Gruppe eines dNTP durch ein H ersetzt ist

c. Strangsynthese



d. Ergebnis: die Autoradiographie

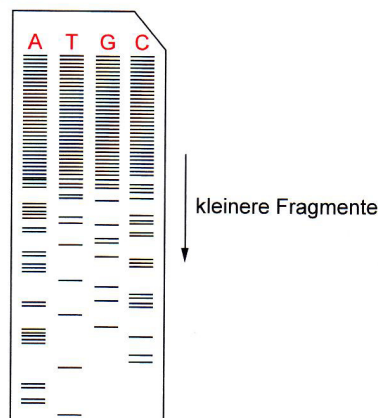


Abb. 15: Schematische Darstellung der DNA-Sequenzierung
Aus: Gentechnologie für Einsteiger

6. Beschreibung der eigenen Versuche

6.1 Untersuchte Personen

Sämtliche von uns untersuchte Personen gehören zu dem in Deutschland lebenden Teil der Familie P.

In dieser Familie sind zwei Fälle von PHA I aufgetreten, nämlich bei den Familienmitgliedern M. P. und B. P., deren Eltern beide heterozygot eine Mutation des α -ENaC-Gens tragen.

Neben den so bereits bekannten Genotypen der Eltern und des Jungen B. P. bestimmten wir die Genotypen von weiteren sechs ihrer Verwandten.

Außer B. P. und seinen Eltern erklärten sich auch seine Großmutter, deren Geschwister, sowie zwei seiner Großtanten mütterlicherseits bereit, sich für diese Studie zur Verfügung zu stellen.

Da die meisten der untersuchten Verwandten keine Kinder haben, bzw. diese mit einer Untersuchung nicht einverstanden waren, war der Großteil der Probanden über 65 Jahre alt, was im Hinblick auf die Versuchsergebnisse berücksichtigt werden muss.

6.2 Untersuchungsmethoden

6.2.1 Allgemeines

Neben ihrem Namen, Alter und Geschlecht befragten wir die Probanden hinsichtlich ihrer sportlichen Aktivitäten und ihrer (subjektiv empfundenen) Stressexposition in Beruf und Privatleben; außerdem nach speziellen Risikofaktoren für Hypertonie, wie Rauchen, Alkohol- und Kaffeekonsum.

6.2.2 Klinische Untersuchungen

Wir bestimmten Größe, Gewicht und danach die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte und die Herzfrequenz jedes untersuchten Familienmitglieds zu Beginn der Untersuchung und nach einer Sitz- bzw. Liegezeit von 30 Minuten.

6.2.3 Laborchemische Befunde

An Untersuchungsmaterial stand uns EDTA-Blut, Blutserum und 24h-Sammelurin zur Verfügung, wobei wir die Serum-Elektrolyte und Blutfette, sowie die Elektrolyte aus einem Teil des Sammelurins im Institut für Klinische Chemie der LMU in München bestimmen ließen.

Aldosteron und die Plasminogen-Aktivität aus dem EDTA-Blut wurden ebenso wie die Sammelurinwerte für Aldosteron-ER, TH-Aldosteron, freies 18-OH-B und freies 18-OH-Cortisol im Labor der Universität Heidelberg ermittelt.

Die einzelnen Werte sind in den Tabellen 9 - 11 aufgelistet.

6.2.4 Molekulargenetische Untersuchungen

Alle molekulargenetischen Untersuchungen führten wir selbst im Humangenetischen Labor von Frau Dr. Nevinny-Stickel-Hinzpeter durch, wobei uns eine Probe der DNA des Indexpatienten B.P. als Referenz diente.

Anfangs war lediglich bekannt, dass sich die entscheidende Mutation auf dem α -ENaC-Gen befindet. Da aber verschiedene Lokalisationen auf den einzelnen Genabschnitten für PHA I verursachende Mutationen beschrieben sind, (s. Kapitel 3.1.2), untersuchten wir die DNA von B. P. zunächst auf Veränderungen in Exon 2 und Exon 11 ohne dort jedoch Veränderungen feststellen zu können.

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass in dieser Familie eine Mutation im Exon 3 des α -ENaC-Gens für die Krankheit verantwortlich ist, konzentrierten wir unsere weitere Forschung auf diesen Genabschnitt.

6.2.5 Statistische Auswertung

Als statistische Analyse führten wir den "One-Sample T-Test" durch, der sehr kleine Kollektive mit einem vorgegebenen Standardwert vergleicht, (in unserem Fall der Standard-Mittelwert des arteriellen Blutdrucks MAP), (s. Tab. 5).

Beschreibung des Tests:

Durch diesen Test sollte verglichen werden, ob der Mittelwert des Blutdrucks der Heterozyotengruppe signifikant vom Blutdruck der Normalbevölkerung (MW = 99) [31] abweicht.

Aufgrund der geringen Stichprobenzahl wurde der "One-Sample T-Test" verwendet (SPSS software version 14.0).

Die Nullhypothese H_0 lautete: "Das Stichprobenmittel weicht vom Mittel der Normalbevölkerung nicht ab". Liegt die Wahrscheinlichkeit hierfür unter $p = 0,05$, dann wird die Nullhypothese abgelehnt und angenommen, dass das Blutdruckmittel der Heterozyotenpopulation von der Allgemeinbevölkerung verschieden ist.

Das Blutdruckmittel der Heterozyotenbevölkerung beträgt 100,7;

Standardabweichung 10,6. Der t-Wert ist 0,43 bei 6 Freiheitsgraden, was einem p-Wert von $p = 0,685$ entspricht.

Die Nullhypothese kann nicht verworfen werden, die Blutdrücke der Heterozyoten- und der Normalbevölkerung sind statistisch gesehen nicht signifikant verschieden (t-Wert: 0,43; $df = 6$; $p = 0,685$).

Ein grafischer Vergleich der beiden Verteilungen (Abb.16) belegt dies ebenfalls.

Einschränkend muss auf die äußerst geringe Stichprobenzahl ($n = 7$) der Heterozyotenbevölkerung hingewiesen werden.

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
BLUTDRUCK	7	100,714	10,641	4,022

Test Value = 99

Mean Difference	95% Confidence Intervall		t-Value	Degrees of freedom	2-Tail Significance (p-value)
1,71	Lower	Upper	0,43	6	0,685
	-	11,556			
	8,127				

Tab. 5: One-Sample-T-Test: Parameter der durchgeführten Analyse
Aus: Eigene Daten

Quantitative statistische Analysen lassen sich wegen der sehr geringen Anzahl an Probanden bzw. Werten nicht machen, qualitativ zeigt sich aber, dass sich die Blutdruckprofile der Heterozygoten von denen der homozygot gesunden Normalbevölkerung nicht wesentlich unterscheiden, wobei die gemessenen Werte wegen der kleinen Zahl des Kollektivs nicht belastbar sind.

Um eine statistisch quantitative Analyse durchführen zu können, müsste man die sieben Probanden auf das Kollektiv der Normalbevölkerung standardisieren, was aber auf Grund verschiedener zusätzlich vorhandener Störfaktoren wie z.B. das nicht normalverteilte Alter in unserer Stichprobe, nicht zu realisieren ist.

6.3 Durchführungsprotokoll der Experimente

6.3.1 Verwendete Substrate

1. dNTPs: 10mM Mix von invitrogen PCR Grade, (Cat.No.: 18427-013, Lot.No.: 1110078)

2. 5'-Primer: "SCNN-E3F" (AGC TCC TTC ACC ACT CTC GTG), Basecount: 21, lyophilisiert, entsalzt, synthetisiert von metabion GmbH

3. 3'-Primer: „SCNN-E3R“ (GTC AGG AAA GGA GCG CCC ATG), Basecount: 24, lyophilisiert, entsalzt, synthetisiert von metabion GmbH

5'-Primer: “SCNN-E2F” (ACC CTG ACC CTT GCT CTC CCC AAT CCA C), Basecount: 28, lyophilisiert, entsalzt, synthetisiert von metabion GmbH

3'-Primer: „SCNN-E2R“ (GGG GCA GAG GGA CTA ACC GAC), Basecount: 21, lyophilisiert, entsalzt, synthetisiert von metabion GmbH

5'-Primer: “SCNN-E11F” (GAC CTT GAT GAC ACC CCC ATT C), Basecount: 22, lyophilisiert, entsalzt, synthetisiert von metabion GmbH

3'-Primer: „SCNN-E11R“ (CTG GGA CCA GGG CAG GAC TG) Basecount: 20, lyophilisiert, entsalzt, synthetisiert von metabion GmbH

4. normale Taq-Polymerase: 500U (5 U/μl), GibCO (Lot.No.: 1099399)

5. Thermophile Taq-Polymerase: 100U, ROCHE 1681834

6. Big Dye™ Terminator RRMix: Applied Biosystems (Lot.No.: 0110469), Weiterstadt, Deutschland

6.3.2 DNA-Isolierung

Die Isolierung der DNA führten wir mit Hilfe des QIAamp® DNA Blood MIDI—Kits (100) von QIAGEN (Cat.No.51183) gemäß den Angaben des Herstellers durch, salzten die Produkte laut laborinternem Protokoll aus und lagerten die einzelnen Proben tiefgekühlt bei -80°C bis zur Verwendung.

6.3.3 DNA-Vervielfältigung

Zur Amplifizierung der DNA wendeten wir die Methode der LR-PCR an (Expand Long Template System mit 2,5% DMSO und zwei verschiedenen Taq-Polymerasen).

Es wurden PCR-Ansätze von jeweils insgesamt 50µl Volumen nach folgendem Schema hergestellt:

Substrat	Exon 3, Ansatz a (µl)	Exon 3, Ansatz b (µl)
DNA (ca. 100ng)	1	1
H ₂ O dest.	41,1	41,1
10x Puffer ③ (mit 2,5% DMSO)	5	–
10x Puffer (normal)	–	5
dNTPs (10mM)	1	1
5'- Primer (50µM)	0,3	0,3
3'-Primer (50µM)	0,3	0,3
Taq-Polymerase (5 U/µl)	–	0,3
Thermospine (5 U/µl)	0,3	–
gesamt	50	50

Tab. 6: Reaktionsansätze für die PCR

Diese PCR-Ansätze wurden zunächst für 2 Minuten bei 95°C denaturiert; daran schlossen sich 30 Amplifikations-Zyklen nach folgendem Schema an:

- a) 15 Sekunden bei 95°C (Denaturierung)
- b) 15 Sekunden bei 58°C (Annealing)
- c) 45 Sekunden bei 72°C (Elongation).

Nach Inkubation der Ansätze bei 72°C für weitere 5 Minuten folgten noch einmal 25 Zyklen nach gleichem Schema, allerdings mit Verzögerung des Elongationsschrittes um 10 Sekunden je Zyklus.

Als PCR-Produkte erhielten wir DNA-Abschnitte mit einer Größe von 535 Basenpaaren für das Produkt, das Exon 2 enthielt, 108 Basenpaare für den Abschnitt, der Exon 11 enthielt und 277 Basenpaare für das PCR-Produkt, in dem Exon 3 zu finden war.

6.3.4 Analyse der PCR-Produkte

Die fertigen PCR-Produkte wurden mit Fluoreszenz-Blaumarker versetzt, auf Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen, nach dem Prinzip des Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) und der Pulsfeld-

Gelelektrophorese (PFGE) bei einer angelegten Spannung von 80mV aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht analysiert und photographisch dokumentiert, (s. Kapitel 7.3, Abb. 20 - 23). Als Referenzmarker verwendeten wir den Roche-Marker VIII.

6.3.5 Produktreinigung

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kits aus dem QIAquick Spin Handbook von QIAGEN, (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland; March 2001) wobei wir jeweils 40µl PCR-Gemisch-Volumen mit 60µl Tris-Puffer (10mM, pH 8,0) eluierten.

6.3.6 Sequenzier-PCR und Entfärbung der Produkte

Daran schloss sich als nächster Schritt die Sequenzier-PCR an, die wir gemäß dem laborinternen Protokoll durchführten.

Bevor wir die PCR-Produkte der automatischen Sequenzierung zuführten, wurde der RR-Mix (4 verschiedene Nucleotid-Analoga, die mit verschiedenfarbigen Fluoreszenzfarbstoffen versetzt sind), laut des DyeEx Spin Kits® aus dem DyeEx Handbook von QIAGEN entfernt und die Produkte somit wieder entfärbt.

6.3.7 Sanger-Sequenzierung

Für die Sequenzierung (Sanger-Sequenzierung) stellten wir Ansätze nach folgendem Schema her:

Substrat	Menge (µl)
PCR-Produkt	1
Big Dye™ Terminator RRMix	1,5
Primer (5 µM)	0,5
H ₂ O	7
gesamt	10

Tab. 7: Reaktionsansatz der Sanger-Sequenzierung

Diese Reaktionsansätze wurden mit Hilfe des Sequenzier-Geräts ABI PRISM Sequencing Analysis Model 310, Version 3.7 von Applied Biosystems automatisiert analysiert.

Wir führten die Sequenzierung mit dem Genetic Analyzer von Perkin Elmer (Weiterstadt, Deutschland) und der Sequencing Analysis 3.4.1 Software zu Ende.

7. Ergebnisse

7.1 Klinische Untersuchungen

Die klinischen Untersuchungen bestanden neben einer Größen- und Gewichtsbestimmung aus der Messung des arteriellen Blutdrucks jeweils bei Eintreffen der Probanden und nach einer Ruhezeit von 30 Minuten.

24-Stunden-Messungen, wie sie in diesem Zusammenhang zweifellos ebenfalls interessant gewesen wären, waren den Probanden nicht zuzumuten, auf Grund der Tatsache, dass nur einige von ihnen in München oder der näheren Umgebung lebt, und selbst ambulant durchgeführte Messungen mit erheblichem Aufwand verbunden gewesen wären.

Der Blutdruck der Untersuchten lag bis auf zwei Ausnahmen (Probandinnen Nummer 6 und 7, s. Tab. 8) zu Beginn der Untersuchungen außerhalb des Normbereichs, (d.h. RR systolisch >139 mmHg) [31].

Bei allen untersuchten Verwandten außer bei Proband 3 und Probandin 8 sank der Blutdruck nach einer Ruhezeit von 30 Minuten auf Werte von systolischem Druck <150 mmHg.

Die diastolischen Drucke lagen bei allen Personen außer bei den Probanden 3 und 4 nach der Ruhezeit bei <80 mmHg.

Die Herzfrequenz nahm bei allen Probanden im Laufe der Untersuchung zum Teil deutlich ab.

Diese Befunde entsprechen dem Blutdruckverhalten der Normalbevölkerung.

Als Risikofaktoren für Hypertonie gaben die Probanden 2, 3, 6 und 7 Nikotinusus an, während der Koffein- bzw. Alkoholkonsum aller Familienmitglieder anamnestisch eher wenig ausgeprägt war und deshalb eine geringere Rolle für das Blutdruckverhalten spielen dürfte.

Probandnummer	1	2	3	4	5	6	7	8	Normwerte
Blutdruckwert vor der Ruhezeit (mmHg)	145/86	164/94	170/100	155/74 bzw. 160/80	145/80	125/59	138/72	165/83	139/89
Blutdruckwert nach einer Ruhezeit von 30 min. (mmHg)	130/79	148/82	170/100	130/75	138/76	123/56	137/70	155/73	130/80
Raucher	nein	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	

Tab. 8: Ergebnisse der klinischen Untersuchung der einzelnen Probanden, hellblau markiert die homozygot Gesunde

□: Männliche Probanden, □: weibliche Probanden

An Vorerkrankungen ist vor allem der sehr niedrige Blutdruck in ihrer Kindheit erwähnenswert, über den die Mutter der Indexpatienten (Probandin 5) uns berichtete, der sich aber im Laufe der Zeit ohne medikamentöse Therapie von selbst gebessert habe.

Ihr Mann (Proband 1) unterzog sich im Jahr 2000 wegen einer Hyperthyreose einer Radiojod-Behandlung.

Von Proband Nummer 2 sind wiederholte Blutdruckmessungen über 2 bis 3 Monate vorhanden, die vor einigen Jahren durchgeführt wurden, aber keine pathologischen Befunde ergaben.

Zusätzlich führten wir unter den heterozygoten Familienmitgliedern eine Längsschnittanalyse bezüglich ihres Blutdruckverhaltens durch, bei der zwei Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgten.

Wie die Abbildungen 18 und 19 zeigen, lässt das Blutdruckverhalten nach einer Ruhezeit von einer halben Stunde im Vergleich zum initialen Blutdruck einen deutlichen Trend in Richtung niedrigerer Werte erkennen.

Dabei wurde jedoch der Bereich des normalen oder optimalen Blutdrucks nicht unterschritten, sondern der Verlauf der Normalverteilungskurve dieses Kollektivs verschob sich lediglich leicht nach links, d. h. der Blutdruck sank etwas ab. Dieses Kurvenverhalten entspricht dem auch in der Normalbevölkerung erwarteten.

Es lassen sich also bei diesen Probanden im Vergleich zum Normalkollektiv keine Auffälligkeiten feststellen.

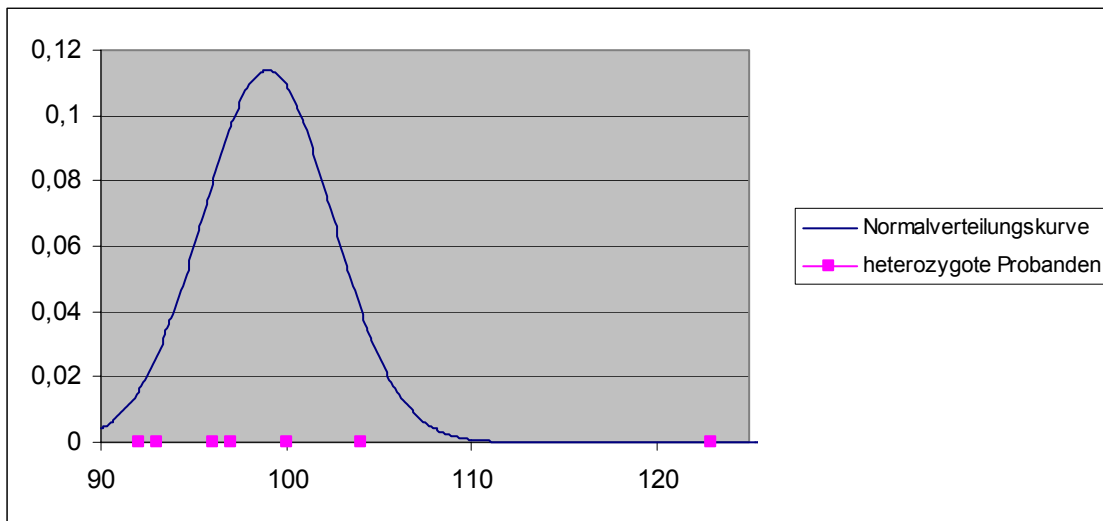


Abb. 16: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) der heterozygoten Probanden im Vergleich zur Normalbevölkerung
Der äußere rechte Punkt stellt Proband 3 dar.

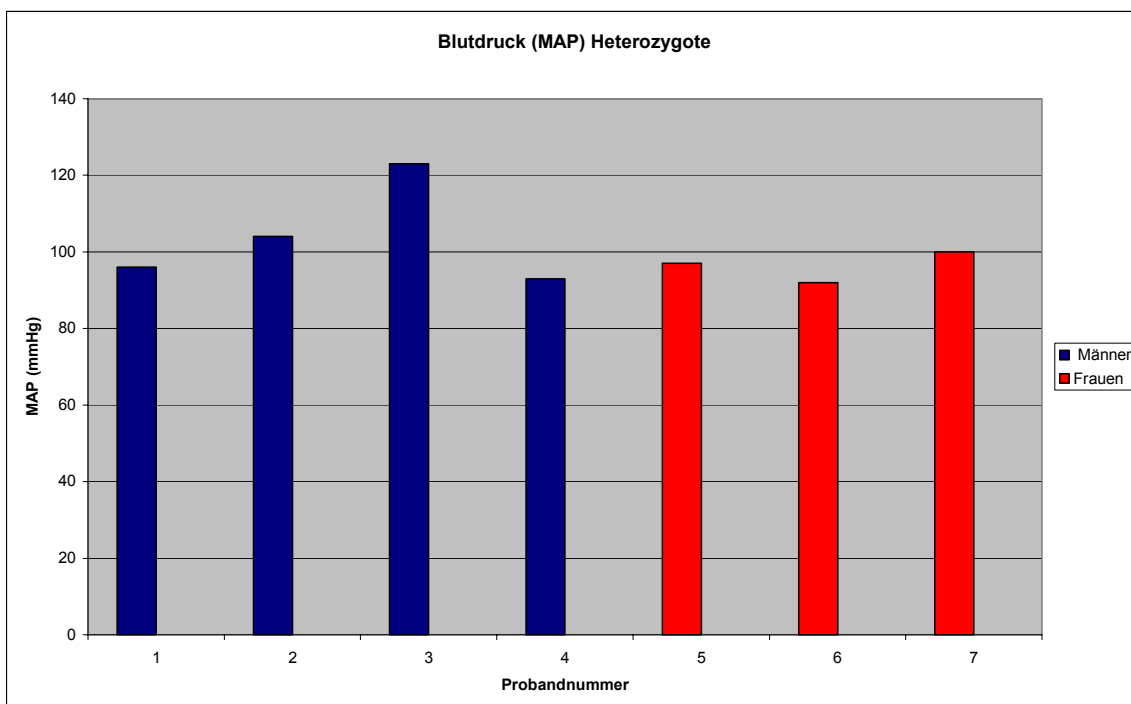


Abb. 17: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) der heterozygoten Probanden nach Höhe und Geschlecht

Histogramm der MAP Werte

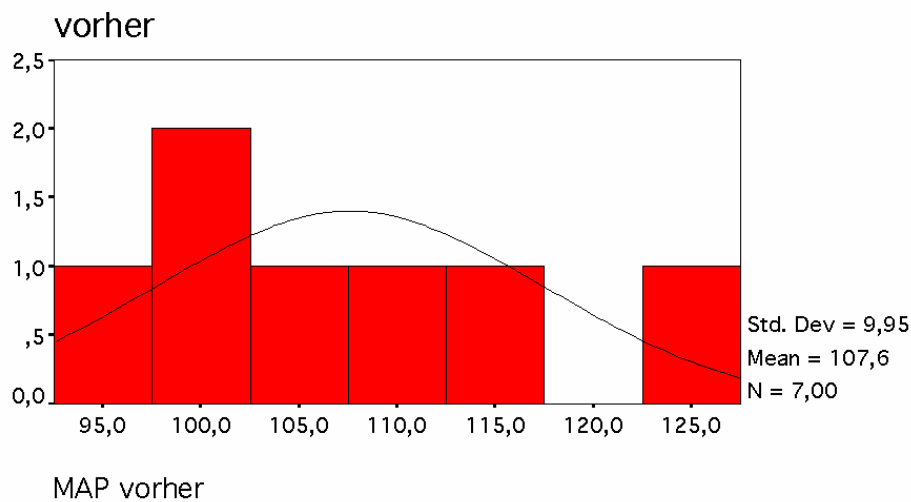


Abb. 18: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) der heterozygoten Probanden vor der Ruhezeit

Histogramm der MAP Werte

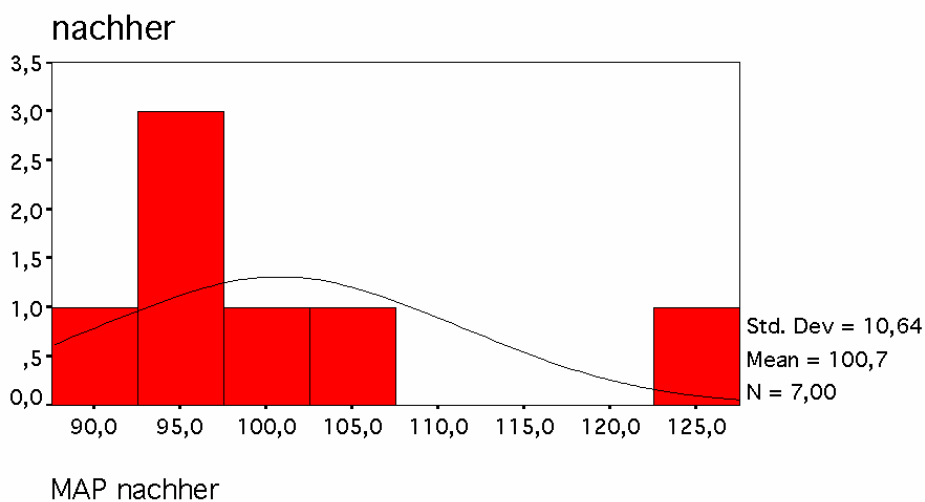


Abb. 19: Mittlerer arterieller Blutdruck der heterozygoten Probanden nach 30 min. Ruhezeit

7.2 Laborchemische Befunde

Die Untersuchungen von Blut und Sammelurin der einzelnen Familienmitglieder wurden in verschiedenen Labors durchgeführt und erbrachten unterschiedliche Resultate:

Die Analyse des EDTA-Blutes (Bestimmung von PRA, Aldosteron, 18-OH-Cortisol und 18-OH-B) und der Mineralocorticoide im Sammelurin wurden im Zentrallabor Universitätsklinikum und Medizinische Fakultät Heidelberg durchgeführt; alle anderen Messungen erfolgten durch das Institut für klinische Chemie der Universitätsklinik der LMU München.

7.2.1 Analyse des EDTA-Blutes

Im EDTA-Blut wurden die Werte für die Plasmarenin-Aktivität, für Aldosteron, für Hydroxy-Cortison (18-OH-Cortisol) und für Hydroxy-Cortisol (18-OH-B) bestimmt. Die Plasmarenin-Aktivität lag zwischen minimal 0,1 ng/ml/h bei Probandin Nummer 7 und maximal 3 ng/ml/h bei Proband 4. Die Aldosteron-Werte variierten zwischen <1,0 ng/dl bei Proband 4 und 11,5 ng/dl bei Proband 2, während die Blutwerte des 18-OH-Cortisols und des freien 18-OH-B eine deutlich größere Schwankungsbreite (minimal 10 bzw. 10,3 ng/dl bei Probandin 8, maximal 138 bzw. 53,6 ng/dl bei Proband 3) aufwiesen, (s. Tab. 9).

Probandnummer	1	2	3	4	5	6	7	8	Normalwerte
PRA (ng/ml/h)	0,9	1,3	0,76	3	1,8	0,6	0,1	0,26	0,2 – 2,8
Aldosteron (ng/dl)	6,2	11,5	5,8	<1,0	9,5	3,7	9	2,8	6 - 30
18-OH-Cortisol (ng/dl)	22	99	138	41	57	58	69	10	43 - 224
18-OH-B	24,6	79,2	53,6	18	39	18	22,5	10,3	23 - 1455

Tab. 9: Untersuchungsbefunde aus dem EDTA-Blut der Probanden, hellblau markiert die homozygot Gesunde

□: Männliche Probanden, □: weibliche Probanden

Damit lagen die Werte der Plasmareninaktivität in 7 Fällen innerhalb des Normbereichs (Probanden 1 - 3 und Probandinnen 5 - 8); Proband 4 zeigte einen leicht erhöhten Wert.

Die Aldosteron-Werte entsprachen bei 5 Probanden (Probanden 1, 2, 3, 5 und 7) der Norm, und 3 Probanden wichen davon ab (Probanden 4, 6 und 8).

Die Werte für 18-OH-Cortisol lagen bei 5 Probanden (Probanden 2, 3 und Probandinnen 5 – 7) im Normbereich und waren bei 3 Probanden leicht (Proband 4) bis deutlich (Probanden 1 und 8) erniedrigt; die Werte für 18-OH-B waren bis auf 2 Fälle (Probanden 4 und 6) alle physiologisch.

7.2.2 Analyse des Blutserums

Neben den Serum-Elektrolyten (Natrium, Kalium, Calcium und Chlorid), wurden auch die Blutfette (Cholesterin und Triglyceride) bestimmt.

Die Werte für Natrium, Chlorid und Calcium entsprachen jeweils den Normwerten, während sich der Wert für Kalium in zwei Fällen (Probanden 3 und 4) auch bei Mehrfachmessungen durch das Labor nicht bestimmen ließ.

Die Werte der Triglyceride lagen bei den meisten Familienmitgliedern im Normbereich, wobei Proband 3 mit erhöhten Werten von 332 mg/dl eine Ausnahme darstellte. Bei den Probandinnen 6 und 7 führten wir die Messung der Blutfette nicht durch, da sie bei der Untersuchung nicht nüchtern waren.

Probandnummer	1	2	3	4	5	6	7	8	Normwerte
Elektrolyte:									
Na (mmol/L)	140,1	142	139	126,2	139,4	141,1	142	142	135 - 145
K (mmol/L)	4,56	4,49	n. m.	n. m.	5,21	4,5	4,34	4,63	3,5 - 5
Cl (mmol/L)	108	108	106	105	105	110	109	112	95 - 110
Ca (mmol/L)	2,46	2,3	2,28	2,24	2,28	2,32	2,33	2,41	2,15 – 2,6
Blutfette:									
Cholesterin (mg/dl)	244	245	352	224	206	n.m., da nicht nüchtern	n.m., da nicht nüchtern	283	140 - 240
Triglyceride	78	178	332	185	152	n.m., da nicht nüchtern	n.m., da nicht nüchtern	77	70 - 200

Tab. 10: Untersuchungsbefunde aus dem Blutserum der Probanden, hellblau markiert die homozygot Gesunde; n.m.: nicht messbar

□: Männliche Probanden, □: weibliche Probanden

Die Serum- Elektrolyte zeigten bis auf 3 Fälle (Probandinnen 4, 5 und 8) alle physiologische Werte. Dagegen waren die Cholesterinwerte bei 4 Probanden

(Probanden 1 - 3 und Probandin 8) erhöht; die Triglyceride lagen aber mit einer Ausnahme (Proband 3) bei allen im Normbereich, (s. Tab. 10).

7.2.3 Analyse des 24h-Sammelurins

Im 24h-Sammelurin wurden neben der Gesamtmenge und den Elektrolyten (Natrium, Kalium und Calcium) auch die Mineralocorticoide Tetra-Hydro-Aldosteron (TH-Aldosteron), Aldosteron-ER, freies 18-OH-Cortisol (Fr. 18-OH-Cortisol) und freies Hydroxy-Cortisol (Fr. 18-OH-B) bestimmt.

Die Gesamtmenge der einzelnen Urinproben reichte von minimal 1750 ml bei Probandin 6 bis zu 4100 ml bei Proband 2.

Die Analyse des Urins auf Mineralocorticoide ergab Werte für Aldosteron-ER (Aldosteron-18-Glucuronid) und Tetra-Hydro-Aldosteron von minimal 2,60 ng/dl bei Probandin 8 bzw. 31,20 µg/24h bei Probandin 7 und maximal 61,69 ng/dl bzw. 266 µg/24h bei Proband 3, während die Werte für freies 18-OH-B (18-Hydroxy-Cortisol) bzw. freies 18-OH-Cortisol zwischen 2,99 µg/24h bzw. 58 µg/24h bei Probandin 8 und 45,14 µg/24h bzw. 123 µg/24h bei Proband 3 schwankten (s. auch Tab.11).

Probandnummer	1	2	3	4	5	6	7	8	Norm- werte
Gesamtmenge	3100	4100	3700	2500	3300	1750	1300	2200	
Elektrolyte: Na (mmol/L)	105,4	56,4	134,8	84,1	76,2	69,7	98,1	121,9	2,8 - 30
K (mmol/L)	28,15	13,83	82,88	36,88	37,52	26,39	19,71	28,59	50 - 200
Ca (mmol/L)	2,48	1,07	4,35	0,29	0,81	2,22	4,94	1,69	30 – 100
Mineralocorticoide: TH-Aldosteron (µg/24h)	73	209,1	266,4	80	76	31,5	31,2	41	7,5 m 6,2 w
Aldosteron-ER (ng/dl)	7,9	25,42	61,69	14,25	16,7	7,35	4,42	2,6	10 - 70
Fr. 18-OH-Cortisol (µg/24h)	120	422,3	1235,8	125	118	108,5	75,4	58	50 -150
Fr 18-OH-B (µg/24h)	7,1	13,94	45,14	8,5	10	3,15	2,99	4,4	1,5 – 6,5

Tab. 11: Untersuchungsbefunde aus dem 24h-Sammelurin der Probanden, **hellblau** markiert die homozygot Gesunde

□: Männliche Probanden, □: weibliche Probanden

Die Urin-Elektrolyte Natrium und Calcium entsprachen bei allen Familienmitgliedern Normwerten, (siehe Tab.11).

Die Urinwerte für Kalium waren dagegen bei 5 Probanden (Probanden 1 und 2 und 6 – 8) erniedrigt.

Das Aldosteron-ER lag bei allen Probanden außer bei Proband 3 im Normbereich, das Tetra-Hydro-Aldosteron war in einem Fall (Proband 1) leicht erniedrigt, bei 3 Probanden normal (Probandinnen 6 - 8) und in 4 Fällen erhöht (Probanden 2 - 5).

Die Werte des freien 18-OH-Cortisols waren bei 3 Probanden (Probandinnen 6 - 8) normal und bei 5 Probanden zum Teil leicht, (Probanden 1, 4 und 5), zum Teil deutlich erhöht (Probanden 2 und 3).

Das freie Hydroxy-Cortisol entsprach bei 2 Probanden (Probandinnen 7 und 8) der Norm und war bei 6 Probanden (Probanden 1 – 6) erhöht, in einem Fall sogar exzessiv (Proband 3).

Wie auch anhand der Grafiken (Abb. 16 und 17) zu erkennen, nimmt Proband 3 bei vielen Untersuchungsergebnissen aus unbekanntem Grund und ohne, dass dies durch seinen Genotyp erklärbar wäre, eine Sonderstellung ein: Sowohl sein

Blutdruck war mit Werten von 170/100 mmHg deutlich erhöht, als auch die Blutfette und die Werte für Tetra-Hydro-Aldosteron und freies Hydroxy-Cortisol im Urin. Eine weitere Messung zur Kontrolle konnte nicht durchgeführt werden, da das der Proband ablehnte.

Das Referenzlabor für die Werte der Klinischen Chemie und den 24-Stunden-Sammelurin war das Institut für Klinische Chemie der LMU München; das Referenzlabor der Hormonwerte war das Zentrallabor Universitätsklinikum und Medizinische Fakultät Heidelberg.

Der Referenzwert für den MAP ist dem Buch „Innere Medizin“, Classen, Diehl, Kochsiek 2004 [31] entnommen.

7.3 Molekulargenetische Untersuchungen

Durch Untersuchung der DNA des Indexpatienten B.P. gelang es uns, die von Dr. David Geller beschriebene [unveröffentlichte Daten] und in der Familie P. krankheitsauslösende Mutation im Exon 3 darzustellen, die in homozygoter Ausprägung vorliegt.

Die Analyse für die Exons 2 und 12 des α ENaC-Gens (SCNN1A) ergab keine Abweichung der Gensequenz im Vergleich zur Normalbevölkerung.

Beide Eltern von B. tragen dieselbe Mutation an gleicher Stelle in Exon 3, allerdings in heterozygoter Form, weshalb sie phänotypisch unauffällig sind.

Bei allen weiteren Familienmitgliedern zeigte sich ebenfalls die heterozygote Veränderung der Gensequenz außer bei Probandin 6, die homozygot gesund ist. Die Abbildungen 20 – 23 zeigen die Darstellung der Exons 2, 3 und 11 des SCNN1A-Gens mittels Gelelektrophorese. Die linken Spuren sind der Referenzmarker (Roche-Marker Nr. VIII); die Spuren rechts daneben stellen die jeweiligen Exons dar.

In Abbildung 20 sind die Exons 2 und 11 des Indexpatienten abgebildet (jeweils 2 Banden), die beide keine Mutation tragen.

In Abbildung 21 sieht man Exon 3 des Indexpatienten (2 Banden), das mit zwei unterschiedlichen Puffern amplifiziert wurde (P_{norm} und $P_{\text{③}}$).

Die Abbildungen 22 und 23 zeigen das Exon 3 der Verwandten (jeweils 1 Bande).

Links der Abbildungen sind die Referenzgrößen des Markers angegeben, rechts der Abbildungen die entsprechenden realen Größen der Exons, wie sie durch Gensequenzierung ermittelt wurden (bp = Basenpaare).

Roche-Marker VIII:

501.489 bp

110 bp

Reale Größe:

535 bp

108 bp

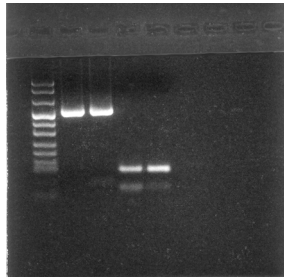


Abb. 20: Exons 2 und 11 des Indexpat.:

Die linke Spur zeigt den Marker,

die 4 Banden rechts daneben
stellen Exon 2 und Exon 11 dar

Roche-Marker VIII:

242 bp

Reale Größe:

277 bp

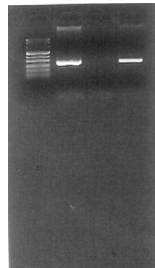


Abb. 21: Exon 3 des Indexpat.:

Die linke Spur zeigt den Marker

die beiden Banden rechts daneben
stellen Exon 3 dar, (mittlere Bande mittels
Standard-Puffer amplifiziert, Bande ganz
rechts mittels Puffer 3 [P³] amplifiziert)

Roche-Marker VIII:
242 bp

Reale Größe:
277 bp

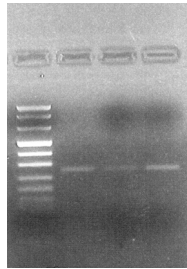


Abb. 22: Exon 3 Verwandte 1-3:
Die linke Spur zeigt den Marker,
die 3 Banden rechts daneben
stellen Exon 3 dar.

Roche-Marker VIII:
242 bp

Reale Größe:
277 bp

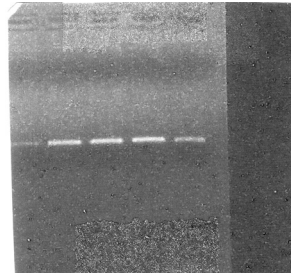


Abb. 23: Exon 3 Verwandte 4-8

Die Ergebnisse der Gensequenzierung für den Indexpatienten und die einzelnen Verwandten sind in den Abbildungen 24 und 25 sowie 27 bis 32 dargestellt.

IV. DISKUSSION

In der Annahme, dass eine heterozygot vorliegende Mutation im PHA Typ I auslösenden Gen (SCNN1A) den arteriellen Blutdruck beeinflussen könnte, führten wir klinische und molekulargenetische Untersuchungen an 8 Verwandten zweier Pseudohypoaldosteronismus-Patienten durch.

Als laborchemische Parameter bestimmten wir verschiedene Elektrolyte im Blutserum und im Urin, sowie die Blutfette, die Plasmareninaktivität und die Konzentrationen der Glucocorticoide Hydroxy-Cortisol und freies 18-OH-Cortisol. Außerdem wurde die Konzentration des Mineralocorticoids Aldosteron und seiner Derivate Aldosteron-ER und Tetra-Hydro-Aldosteron im Serum und im Urin gemessen.

Unsere Untersuchungen der DNA im molekulargenetischen Labor zeigten, dass sieben der untersuchten acht Personen heterozygot bezüglich der SCNN1A-Mutation sind, die in homozygoter Ausprägung das Krankheitsbild des Pseudohypoaldosteronismus auslöst. Eine der Familienmitglieder (Probandin 6) ist homozygot gesund.

Anamnestisch ließen sich beim Großteil der Verwandten keine den Blutdruck betreffende Auffälligkeiten (wie z.B. orthostatische Probleme) eruieren. Allerdings berichtete die Mutter der Patienten über eine bei ihr in der Kindheit diagnostizierte arterielle Hypotonie, die sich bis zur Adoleszenz aber gebessert habe.

Eine Großtante (Probandin 7) nimmt regelmäßig Blutdruck senkende Medikamente (β -Blocker) ein, eine weitere Großtante (Probandin 6) β -Blocker nach Bedarf und ein Großonkel (Proband 4) AT II-Rezeptorblocker (Co-Diovan).

Die durchgeführten Blutdruckmessungen ergaben alle Blutdruckwerte, die sich spätestens bei der zweiten Messung im normalen bis hochnormalen Bereich befanden, bis auf eine Ausnahme, die deutlich über den physiologischen Werten lag (Proband 3):

Proband 1, der Vater der Patienten, zeigte bei Eintreffen einen leicht erhöhten Blutdruck von 145/86 mmHg (MAP = 106), der sich nach 30 min. Ruhezeit auf Werte von 130/79 mmHg (MAP = 96) normalisierte. Risikofaktoren für die Entwicklung einer Hypertonie ließen sich anamnestisch nicht eruieren. Allerdings bestanden eine leichte Hypercholesterinämie (244 mg/dl) und eine Erniedrigung des Kaliums im Urin (28,15 mmol/24h).

Obwohl die genetische Analyse ergab, dass er heterozygot bezüglich der SCNN1A-Mutation ist, entsprachen die von uns getesteten Parameter weitgehend der Norm, sodass man davon ausgehen kann, dass sich die Genmutation in diesem Fall nicht bemerkbar macht.

Proband 2 (ein Großonkel der Patienten) wies bei Eintreffen erhöhte Blutdruckwerte auf: 164/94 mmHg (MAP = 117), die auch nach 30 Minuten Ruhezeit lediglich auf hochnormale Werte von 148/82 mmHg (MAP = 104) abfielen. Er berichtete uns von vorhandenen Langzeit-Blutdruck-Messungen über 2 bis 3 Monate, die altersentsprechend gewesen waren.

Auffällig war bei ihm neben einer leichten Hypercholesterinämie die Erhöhung der Mineralocorticoide im Urin:

Das Freie 18-OH-Cortisol und das Freie 18-OH-B waren auf über das Doppelte des oberen Normwerts erhöht, das Tetra-Hydro-Aldosteron sogar auf das Dreifache der oberen Norm.

Dennoch ist der Proband klinisch völlig unauffällig.

Proband 3 (ebenfalls ein Großonkel der Patienten) zeigte die am weitesten von der Norm abweichenden Werte:

Nicht nur die Blutdruckwerte waren schon bei der ersten Messung auf Werte von 170/100 mmHg (MAP = 123) erhöht, sie blieben auch nach 30 Minuten Ruhezeit unverändert hoch bei 170/100 mmHg (MAP = 123). Da der Proband etwa 300 km von München entfernt wohnt, wurde das Blut von der Hausärztin abgenommen und dann in unser Labor geschickt. Der gemessene Serum-Kalium-Wert lag bei 9,81, was auf einen Messfehler oder die Zersetzung der Blutprobe zurückzuführen sein muss.

Es bestand sowohl eine mäßige Hypercholesterinämie, als auch eine Triglyzeridämie.

Die Mineralocorticoide im Urin waren zum Teil exzessiv erhöht: Fr.18-OH-Cortisol 1235,80 µg/d, Fr.18OH-B 45,14 µg/d, TH-Aldosteron 266,4 µg/d).

Anamnestisch gab der Proband als Hypertonie-Risikofaktor lediglich einen mäßigen Nikotinabusus an. Allerdings konsultierte er sehr selten seine Hausärztin, sodass keine regelmäßigen Blutdruck- oder Laborkontrollen durchgeführt wurden. Da er sich aber gesund fühlt, scheint auch hier die SCNN1A-Mutation keine klinisch erkennbaren Auswirkungen zu haben.

Die Blutdruckwerte von **Proband 4** (ein weiterer Großonkel der Patienten) entsprachen bei Eintreffen dem Hypertoniestadium 1 [31]: 155/74 mmHg (MAP = 101). Nach 30 min. Ruhezeit fielen sie auf hochnormale Werte von 130/75 mmHg (MAP = 93) ab. Allerdings kann man sein Blutdruckprofil nur eingeschränkt beurteilen, da er ATII-Rezeptorenblocker (Co-Diovan[®]) einnimmt. Er war der einzige der Verwandten, bei dem eine Erniedrigung des Serum-Natriums nachgewiesen werden konnte (126 mmol/l), deren Ursache eventuell die bei dem Probanden in heterozygoter Form vorliegende Mutation des SCNN1A-Gens sein könnte. Das Urin-Profil zeigte keine Auffälligkeiten bezüglich der Elektrolyte, die Hormone waren jedoch alle erhöht (Fr.18-OH-Cortisol 125 µg/d, Fr.18OH-B 8,5 µg/d, TH-Aldosteron 80 µg/d).

Probandin 5, die Mutter der Patienten berichtete über eine mäßig ausgeprägte Hypotonie im Kindesalter und zeigte auch bei unseren Untersuchungen mit Werten von 138/76 mmHg (MAP = 97) einen normalen Blutdruck, obwohl sie mit einem Gewicht von 89 kg (BMI =30,1) eine Adipositas Grad I und damit Risikofaktoren für die Entwicklung einer Hypertonie aufweist. Dass sich diese nicht manifestiert, könnte in der bei der Probandin heterozygot vorliegenden Mutation im SCNN1A-Gen begründet sein.

Außerdem fiel eine leichte Hyperkaliämie von 5,21 mmol/l bei ihr auf, die ebenfalls durch die Gen-Mutation bedingt sein könnte.

Die Elektrolyte im Urin lagen alle im Normbereich, die Hormone waren allerdings zum Teil deutlich erhöht (Fr.18-OH-Cortisol 118 µg/d, Fr.18OH-B 10 µg/d, TH-Aldosteron 76 µg/d).

Probandin 6 (eine Großtante) ist die einzige homozygot Gesunde der Verwandten und hatte mit Werten von 123/56 mmHg (MAP = 78) im Vergleich zu allen anderen Probanden den niedrigsten Blutdruck.

Auch die anderen Laborwerte waren bis auf ein erhöhtes Cortisol im Urin (118 µg/24h) alle im Normbereich, was bei ihrem Genotyp nicht anders zu erwarten war. Einschränkend muss darauf hingewiesen werden, dass sie bei Bedarf β-Blocker einnimmt, die eventuell dazu beitragen, dass die gemessenen Blutdruckwerte nicht erhöht, sondern physiologisch waren.

Probandin 7 (eine Großtante, Schwester von Probandin 6) zeigte bei Eintreffen einen hochnormalen Blutdruck von 138/72 mmHg (MAP = 94), der nach der Ruhezeit von 30 min. nochmals minimal abfiel auf 137/70 mmHg (MAP = 92). Allerdings kann man diese Werte nur eingeschränkt beurteilen, da die Probandin regelmäßig β-Blocker einnimmt.

Die bei ihr bestimmten Laborwerte waren bis auf ein leicht erniedrigtes Kalium im Urin (26,39 mmol/24h) unauffällig, sodass man auch bei ihr von einer klinisch stummen Mutation des SCNN1A-Gens ausgehen kann.

Probandin 8 (eine weitere Großtante) zeigte bei Eintreffen erhöhte Blutdruckwerte von 165/83 mmHg (MAP = 110), die sich auch nach 30 Minuten Ruhezeit nicht auf normotone Werte normalisierten: 155/73 mmHg (MAP = 100).

Neben einer Hypercholesterinämie (283 mg/dl) fiel bei ihr ebenfalls ein minimal erniedrigter Wert des Kaliums im Urin von 28,59 mmol/24h auf.

Nachdem sich in ihrem Fall keine hypotone Blutdrucklage nachweisen ließ, scheint auch hier die vorhandene Mutation des SCNN1A-Gens keine Auswirkungen auf den Blutdruck zu haben.

Interessanterweise zeigte sich bei der einzigen homozygot Gesunden (Probandin 6) der niedrigste Wert für den arteriellen Blutdruck, der deutlich unter denjenigen der anderen Verwandten liegt.

Dies steht im Widerspruch zu der Hypothese, dass eine Mutation des SCNN1A-Gens bereits in heterozygoter Ausprägung eine im Vergleich zur Normalbevölkerung hypotone Blutdrucklage bewirken kann.

Liegt die Genmutation in homozygoter Form vor, wie es beim klinisch manifesten Pseudohypoaldosteronismus Typ I der Fall ist, führt diese bekanntlich zu massiven Hypotonien.

Auch die relevanten Laborwerte der beiden Indexpatienten waren bereits wenige Tage nach der Geburt spezifisch verändert, (s. auch Kapitel 4):

Beim Mädchen bestanden im Alter von 5 Tagen eine massive Hyperkaliämie von 8,4 mmol/l und eine Hyponatriämie von 115 mmol/l [23].

Zwei Tage später waren die Blutwerte trotz Therapie mit Corticoiden noch nicht im Normbereich [23]: Es lag eine Hyperkaliämie von 8,7 mmol/l vor, das Serum-Natrium war mit 130 mmol/l erniedrigt, das Calcium im Blutserum dagegen deutlich erhöht (5,4 mmol/l). Der Serumwert für Chlorid lag an der oberen Normgrenze bei 110 mmol/l.

Auch die Bestimmung der Hormone Aldosteron, 18-OH-Cortisol und 18-OH-B zeigte Auffälligkeiten: Während die Werte für die Glucocorticoide (18-OH-Cortisol und 18-OH-B) der Norm entsprachen, war der Aldosteron-Wert 20fach erhöht. Die Plasmarenin-Aktivität war ebenfalls stark erhöht (9fach).

Zusammengefasst entsprechen diese Werte den klassischen Veränderungen, die beim Pseudohypoaldosteronismus Typ I auftreten.

Der Junge zeigte ebenfalls stark von der Norm abweichende Werte:

Am 6. Lebenstag lag das Serum-Natrium bei 133 mmol/l, und es bestand eine Hyperkaliämie von 8,0 mmol/l [23].

Im Alter von 2 Monaten wurden auch veränderte Werte für das Aldosteron im Blut (4fach erhöht) und die Plasmarenin-Aktivität (3fach erhöht) festgestellt [23].

Die Serum-Elektrolyte beider Patienten erreichten während der gesamten Kindheit nur unter Infusionstherapie normale Werte [23], wohingegen die heterozygoten Verwandten phänotypisch völlig unauffällig sind. Man kann also davon ausgehen, dass diese den Pseudohypoaldosteronismus auslösende Mutation nur in homozygoter Ausprägung zur Ausbildung klinischer Symptome führt.

Beim Liddle-Syndrom [45] und beim Bartter-Syndrom [28] scheint dagegen das Vorliegen einer heterozygoten Mutation ausreichend zu sein, um Symptome hervorzurufen.

Ein AME (Apparent Mineralocorticoid Excess) bildet sich beim Vorliegen von Compounds (heterozygoten Mutationen in unterschiedlichen Allelen) aus. Besteht nur eine rein heterozygote Mutation, kann auch diese den Blutdruck beeinflussen [81].

Li et al. konnten bei normalem Phänotyp einen veränderten Cortisol-Stoffwechsel feststellen, wenn die Mutation in heterozygoter Form vorlag [82].

Es ist interessant, dass die homozygote Ausprägung der 1856insG-Mutation beim Pseudohypoaldosteronismus Typ I also sehr gravierende Auswirkungen auf sowohl die Elektrolyt-Konzentrationen im Blutserum, als auch auf die Hormonwerte (Aldosteron, 18-OH-Cortisol und 18-OH-B) und die Plasminogen-Aktivität hat, während sie sich in der heterozygoten Form in den meisten Fällen klinisch nicht bemerkbar macht.

Auch den arteriellen Blutdruck scheint die heterozygot vorliegende Mutation kaum zu beeinflussen:

Betrachtet man das Blutdruckprofil der 7 Heterozygoten im Vergleich zur Normalbevölkerung, lässt sich nur eine geringe Diskrepanz der beiden Kurven (Abb.26) zeigen. Dabei liegt der Gipfel der Heterozygoten-Kurve rechts von demjenigen der Normalbevölkerung, d.h. der Blutdruck der Probanden war durchschnittlich sogar höher als unter homozygot Gesunden. Das ist vor allem auf den deutlich erhöhten Wert von Proband 3 (MAP = 123) zurückzuführen, der die gesamte Kurve nach rechts verschiebt. Hätte man die Stichprobenzahl größer wählen können, dann könnte sich solch ein Wert nicht in diesem Ausmaß auswirken, aber in unserem Fall war dies auf Grund der geringen Anzahl an Heterozygoten nicht durchführbar, sodass hier die gesamte Analyse beeinflusst wird.

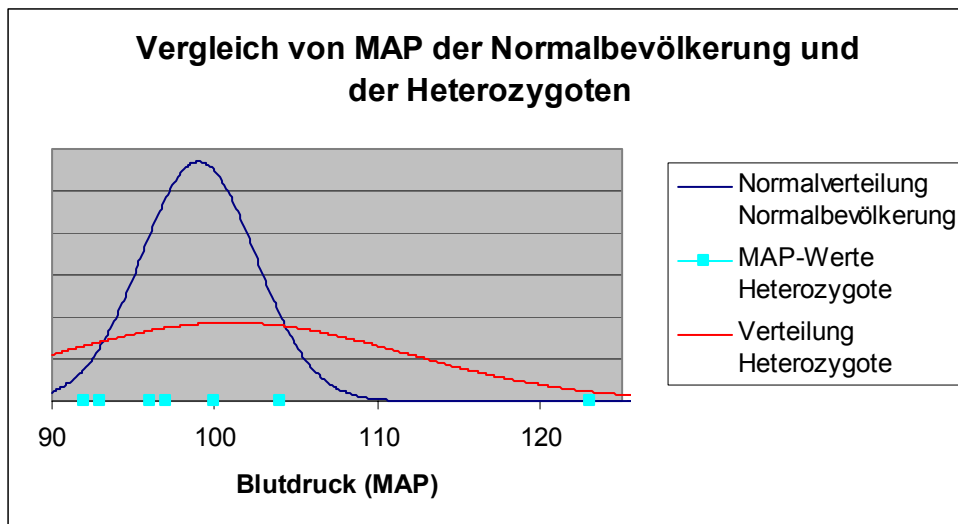


Abb. 26: Vergleich des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) zwischen der Normalbevölkerung und der Heterozygoten-Population

Um genauere Aussagen bezüglich des Blutdruckprofils Heterozygoter machen zu können, müsste man Untersuchungen in weit größerem Umfang durchführen, was allerdings auf Grund der nur sehr geringen Probandenzahlen nicht möglich ist. Betrachtet man unsere Ergebnisse allerdings in qualitativer Weise, kann man erkennen, dass sich in einigen Fällen keine Hypertonie ausbildete, obwohl Risikofaktoren dafür vorhanden wären. Ob dies an der vorliegenden SCNN1A-Mutation liegt, oder andere Ursachen hat, lässt sich aber nicht mit Sicherheit sagen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Hypertonie und damit assoziierte Krankheiten sind in den Industrienationen die Ursache von ca. 25% aller Todesfälle.

Neben der Hypertonie unklarer Genese (essentielle Hypertonie) sind eine Reihe von erblichen Krankheiten bekannt, die zu Veränderungen des Blutdruckverhaltens führen.

Dabei kann sich entweder ein zu hoher (**Hypertonie**), oder ein zu niedriger Blutdruck (**Hypotonie**) ausbilden.

Einige dieser Erbkrankheiten sind mit Funktionsveränderungen des Amilorid-sensitiven epithelialen Natriumkanals (ENaC) verbunden.

Wenn der ENaC in seiner Aktivität gesteigert ist, kommt es zu vermehrter Na⁺-Rückresorption, Zunahme des Blutvolumens und nachfolgend Hypertonie, wie es beim Krankheitsbild des Liddle-Syndroms zu sehen ist.

Ein teilweiser oder auch totaler Funktionsverlust des Natriumkanals, der die Ursache des Pseudohypoaldosteronismus Typ I ist, führt dagegen zu einem mehr oder weniger stark ausgeprägten Salz- und Wasserverlust über die Niere (und/oder andere NaCl-resorbierende Epithelien), begleitendem Volumenmangel und nachfolgender **Hypotonie**.

Bisher sind 16 Mutationen der für den ENaC codierenden Gene bekannt.

Man unterscheidet eine dominante von einer rezessiv vererbten Form des PHA I. Die dominant vererbte Variante zeigt einen milderen Verlauf. Die rezessive Form führt in den meisten Fällen bereits in der ersten Lebenswoche zu massiver Hypotonie und lebensbedrohlichen Elektrolyt-Verschiebungen.

Unter der Hypothese, dass ein mutiertes SCNN1A-Gen bereits in heterozygoter Ausprägung Auswirkungen auf den Blutdruck der betroffenen Personen haben könnte, führten wir Untersuchungen an 8 Probanden durch.

Sie sind alle erstgradig mit 2 Indexpatienten verwandt, die an der rezessiven Form der Krankheit leiden.

In unseren Untersuchungen bestimmten wir den arteriellen Blutdruck und verschiedene mit dem Krankheitsbild des PHA I in spezifischer Weise korrelierte laborchemische Parameter.

Außerdem führten wir molekulargenetische Versuche durch, um den Genotyp der 8 Verwandten zu bestimmen.

Es zeigte sich, dass 7 der 8 untersuchten Personen heterozygot bezüglich des mutierten Allels sind, und nur eine einzige Verwandte homozygot gesund ist.

Hinsichtlich der Fragestellung, ob sich bei Heterozygoten Unterschiede im Blutdruckverhalten oder in der Konzentration bestimmter Elektrolyte sowie Hormone im Blut oder Urin im Vergleich zur Normalbevölkerung zeigen, konnten wir auf Grund des sehr kleinen Kollektivs nur qualitative, nicht jedoch statistisch quantitative Aussagen machen (s. Tab. 5 und Abb. 26).

Dazu müssten weitere Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Personen durchgeführt werden. Das ist jedoch auf Grund der großen Seltenheit dieser Krankheit sehr schwierig.

Unsere Versuche zeigten, dass die einzige homozygot Gesunde unseres Kollektivs, die keine Mutation in ihrem ENaC-Gen zeigte, die niedrigsten Blutdruckwerte aufwies. Das stand im Widerspruch zu unseren Erwartungen, dass bereits ein mutiertes Allel des ENaC den Blutdruck in Richtung hypotoner Werte verändern kann. Die Heterozygoten hatten jedoch alle höhere, (nicht niedrigere), Blutdruckwerte als die homozygot Gesunde.

Ob dies ein Zufallsbefund ist, oder ob es durch Faktoren erklärt werden kann, die mit dem mutierten Allel des SCNN1A-Gens in Zusammenhang stehen, müsste durch weiterreichende Forschung geklärt werden.

VI. VERWENDETE LITERATUR

1. Agarwal, M.K. and M. Mirshahi, General overview of mineralocorticoid hormone action. *Pharmacol Ther*, 1999. **84**(3): p. 273-326.
2. Alvarez de la Rosa, D., et al., Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annu Rev Physiol*, 2000. **62**: p. 573-94.
3. Aperia, A.C., Regulation of sodium transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1995. **4**(5): p. 416-20.
4. Arai, K., et al., Physiological and molecular aspects of mineralocorticoid receptor action in pseudohypoaldosteronism: a responsiveness test and therapy. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994. **79**(4): p. 1019-23.
5. Arai, K., et al., Polymorphisms of amiloride-sensitive sodium channel subunits in five sporadic cases of pseudohypoaldosteronism: do they have pathologic potential? *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. **84**(7): p. 2434-7.
6. Armanini, D., T. Strasser, and P.C. Weber, Characterization of aldosterone binding sites in circulating human mononuclear leukocytes. *Am J Physiol*, 1985. **248**(3 Pt 1): p. E388-90.
7. Arriza, J.L., et al., Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*, 1987. **237**(4812): p. 268-75.
8. Aviv, A., Hypothesis: pulse pressure and human longevity. *Hypertension*, 2001. **37**(4): p. 1060-6.
9. Baens, M., et al., Isolation and regional assignment of human chromosome 12p cDNAs. *Genomics*, 1995. **29**(1): p. 44-52.
10. Bähring, S., et al., Autosomal-dominant hypertension with type E brachydactyly is caused by rearrangement on the short arm of chromosome 12. *Hypertension*, 2004. **43**(2): p. 471-6.
11. Barbry, P. and P. Hofman, Molecular biology of Na⁺ absorption. *Am J Physiol*, 1997. **273**(3 Pt 1): p. G571-85.
12. Barker, D.J., et al., The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *Bmj*, 1993. **306**(6875): p. 422-6.
13. Barker, D.J., et al., Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*, 1989. **2**(8663): p. 577-80.
14. Beaumont, K. and D.D. Fanestil, Characterization of rat brain aldosterone receptors reveals high affinity for corticosterone. *Endocrinology*, 1983. **113**(6): p. 2043-51.
15. Bengtsson, K., et al., Beta(2)-adrenergic receptor gene variation and hypertension in subjects with type 2 diabetes. *Hypertension*, 2001. **37**(5): p. 1303-8.
16. Benos, D.J., Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. *Am J Physiol*, 1982. **242**(3): p. C131-45.
17. Berdiev, B.K., et al., Subunit stoichiometry of a core conduction element in a cloned epithelial amiloride-sensitive Na⁺ channel. *Biophys J*, 1998. **75**(5): p. 2292-301.
18. Bettinelli, A., et al., Simultaneous mutations in the CLCNKB and SLC12A3 genes in two siblings with phenotypic heterogeneity in classic Bartter syndrome. *Pediatr Res*, 2005. **58**(6): p. 1269-73.
19. Beutler, K.T., et al., Long-term regulation of ENaC expression in kidney by angiotensin II. *Hypertension*, 2003. **41**(5): p. 1143-50.
20. Boucherot, A., R. Schreiber, and K. Kunzelmann, Role of CFTR's PDZ1-binding domain, NBF1 and Cl(-) conductance in inhibition of epithelial Na(+) channels in *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1515**(1): p. 64-71.
21. Brown, T.A., *Gentechnologie für Einsteiger*. Vol. 3. 2002, Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag GmbH
22. Busjahn, A., et al., beta-2 adrenergic receptor gene variations, blood pressure, and heart size in normal twins. *Hypertension*, 2000. **35**(2): p. 555-60.

23. Butenandt, I., H.G. Dorr, and U. Kuhnle, [Pseudohypoaldosteronism--renal salt loss syndrome. Therapy and course exemplified by 2 siblings]. *Monatsschr Kinderheilkd*, 1986. **134**(8): p. 544-6.
24. Canessa, C.M., et al., Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*, 1994. **367**(6462): p. 463-7.
25. Chang, S.S., et al., Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nat Genet*, 1996. **12**(3): p. 248-53.
26. Cheek, D.B. and J.W. Perry, A salt wasting syndrome in infancy. *Arch Dis Child*, 1958. **33**(169): p. 252-6.
27. Chen, S.Y., et al., Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(5): p. 2514-9.
28. Cho, J.T. and L.M. Guay-Woodford, Heterozygous mutations of the gene for Kir 1.1 (ROMK) in antenatal Bartter syndrome presenting with transient hyperkalemia, evolving to a benign course. *J Korean Med Sci*, 2003. **18**(1): p. 65-8.
29. Chraïbi, A. and J.D. Horisberger, Dual effect of temperature on the human epithelial Na⁺ channel. *Pflügers Arch*, 2003. **447**(3): p. 316-20.
30. Classen, M.D., V; Kochsiek, K., *Innere Medizin*. Vol. 3. 1994, München-Wien-Baltimore: Urban und Schwarzenberg 807 - 812; 817 - 818.
31. Classen, M.D., V; Kochsiek, K., *Innere Medizin*. Vol. 5. 2004, München-Jena: Urban und Schwarzenberg. 433.
32. Corey, D.P. and J. Garcia-Anoveros, Mechanosensation and the DEG/ENaC ion channels. *Science*, 1996. **273**(5273): p. 323-4.
33. Cox, R.H., K. Folander, and R. Swanson, Differential expression of voltage-gated K(+) channel genes in arteries from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension*, 2001. **37**(5): p. 1315-22.
34. Dawson, D.C., Ion channels and colonic salt transport. *Annu Rev Physiol*, 1991. **53**: p. 321-39.
35. Disse-Nicodeme, S., et al., A new locus on chromosome 12p13.3 for pseudohypoaldosteronism type II, an autosomal dominant form of hypertension. *Am J Hum Genet*, 2000. **67**(2): p. 302-10.
36. Eaton, D.C. and K.L. Hamilton, The amiloride-blockable sodium channel of epithelial tissue. *Ion Channels*, 1988. **1**: p. 251-82.
37. Ecelbarger, C.A., et al., Vasopressin-mediated regulation of epithelial sodium channel abundance in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. **279**(1): p. F46-53.
38. Edelman, I.S., Mechanism of action of aldosterone: energetic and permeability factors. *J Endocrinol*, 1979. **81**(2): p. 49P-53P.
39. Ely, D.L. and M.E. Turner, Hypertension in the spontaneously hypertensive rat is linked to the Y chromosome. *Hypertension*, 1990. **16**(3): p. 277-81.
40. Ewart, H.S. and A. Klip, Hormonal regulation of the Na(+)-K(+)-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am J Physiol*, 1995. **269**(2 Pt 1): p. C295-311.
41. Fan, Y.S., et al., The human mineralocorticoid receptor gene (MLR) is located on chromosome 4 at q31.2. *Cytogenet Cell Genet*, 1989. **52**(1-2): p. 83-4.
42. Farr, T.J., et al., Human Nedd4 interacts with the human epithelial Na⁺ channel: WW3 but not WW1 binds to Na⁺-channel subunits. *Biochem J*, 2000. **345 Pt 3**: p. 503-9.
43. Feinleib, M., et al., The NHLBI twin study of cardiovascular disease risk factors: methodology and summary of results. *Am J Epidemiol*, 1977. **106**(4): p. 284-5.
44. Firsov, D., et al., The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *Embo J*, 1998. **17**(2): p. 344-52.
45. Freundlich, M. and M. Ludwig, A novel epithelial sodium channel beta-subunit mutation associated with hypertensive Liddle syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2005. **20**(4): p. 512-5.

-
46. Frings, S., R.D. Purves, and A.D. Macknight, Single-channel recordings from the apical membrane of the toad urinary bladder epithelial cell. *J Membr Biol*, 1988. **106**(2): p. 157-72.
 47. Fuller, P.J., F.E. Brennan, and J.S. Burgess, Acute differential regulation by corticosteroids of epithelial sodium channel subunit and Nedd4 mRNA levels in the distal colon. *Pflugers Arch*, 2000. **441**(1): p. 94-101.
 48. Funder, J.W., et al., Mineralocorticoid receptors, salt, and hypertension. *Recent Prog Horm Res*, 1997. **52**: p. 247-60; discussion 261-2.
 49. Fyfe, G.K., A. Quinn, and C.M. Canessa, Structure and function of the Mec-ENaC family of ion channels. *Semin Nephrol*, 1998. **18**(2): p. 138-51.
 50. Garcia-Anoveros, J., et al., BNaC1 and BNaC2 constitute a new family of human neuronal sodium channels related to degenerins and epithelial sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(4): p. 1459-64.
 51. Garty, H., Molecular properties of epithelial, amiloride-blockable Na⁺ channels. *Faseb J*, 1994. **8**(8): p. 522-8.
 52. Garty, H. and D.J. Benos, Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na⁺ channel. *Physiol Rev*, 1988. **68**(2): p. 309-73.
 53. Garty, H. and L.G. Palmer, Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev*, 1997. **77**(2): p. 359-96.
 54. Gogelein, H. and R. Greger, Na⁺ selective channels in the apical membrane of rabbit late proximal tubules (pars recta). *Pflugers Arch*, 1986. **406**(2): p. 198-203.
 55. Gordon, R.D., Syndrome of hypertension and hyperkalemia with normal glomerular filtration rate. *Hypertension*, 1986. **8**(2): p. 93-102.
 56. Gormley, K., Y. Dong, and G.A. Sagnella, Regulation of the epithelial sodium channel by accessory proteins. *Biochem J*, 2003. **371**(Pt 1): p. 1-14.
 57. Gratze, G., et al., beta-2 Adrenergic receptor variants affect resting blood pressure and agonist-induced vasodilation in young adult Caucasians. *Hypertension*, 1999. **33**(6): p. 1425-30.
 58. Guyton, A.C., Abnormal renal function and autoregulation in essential hypertension. *Hypertension*, 1991. **18**(5 Suppl): p. III49-53.
 59. Hamilton, K.L. and D.C. Eaton, Regulation of single sodium channels in renal tissue: a role in sodium homeostasis. *Fed Proc*, 1986. **45**(12): p. 2713-7.
 60. Harley, C.B., et al., The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol*, 1992. **27**(4): p. 375-82.
 61. Harris, P.J. and L.G. Navar, Tubular transport responses to angiotensin. *Am J Physiol*, 1985. **248**(5 Pt 2): p. F621-30.
 62. Hendron, E., et al., Identification of cytoplasmic domains within the epithelial Na⁺ channel reactive at the plasma membrane. *J Biol Chem*, 2002. **277**(37): p. 34480-8.
 63. Hille, B., Ionic channels in nerve membranes. *Prog Biophys Mol Biol*, 1970. **21**: p. 1-32.
 64. Hollenberg, S.M., et al., Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, 1985. **318**(6047): p. 635-41.
 65. Hsueh, Y.P., et al., Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature*, 2000. **404**(6775): p. 298-302.
 66. Husted, R.F., R.D. Sigmund, and J.B. Stokes, Mechanisms of inactivation of the action of aldosterone on collecting duct by TGF-beta. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. **278**(3): p. F425-33.
 67. Ismailov, II, et al., Triple-barrel organization of ENaC, a cloned epithelial Na⁺ channel. *J Biol Chem*, 1996. **271**(2): p. 807-16.
 68. Ismailov, II, et al., Cation permeability of a cloned rat epithelial amiloride-sensitive Na⁺ channel. *J Physiol*, 1997. **504** (Pt 2): p. 287-300.
 69. Joris, L., et al., Patch-clamp study of cultured human sweat duct cells: amiloride-blockable Na⁺ channel. *Pflugers Arch*, 1989. **414**(3): p. 369-72.

70. Kanelis, V., et al., NMR studies of tandem WW domains of Nedd4 in complex with a PY motif-containing region of the epithelial sodium channel. *Biochem Cell Biol*, 1998. **76**(2-3): p. 341-50.
71. Kim, G.H., et al., Long-term regulation of renal Na-dependent cotransporters and ENaC: response to altered acid-base intake. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. **279**(3): p. F459-67.
72. Kobayashi, T. and P. Cohen, Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositol 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J*, 1999. **339** (Pt 2): p. 319-28.
73. Kotanko, P., et al., Essential hypertension in African Caribbeans associates with a variant of the beta2-adrenoceptor. *Hypertension*, 1997. **30**(4): p. 773-6.
74. Kren, V., et al., Y-chromosome transfer induces changes in blood pressure and blood lipids in SHR. *Hypertension*, 2001. **37**(4): p. 1147-52.
75. Kuhnle, U., Pseudohypoaldosteronism: mutation found, problem solved? *Mol Cell Endocrinol*, 1997. **133**(2): p. 77-80.
76. Kuhnle, U., Familial pseudohypoaldosteronism. *Curr Ther Endocrinol Metab*, 1997. **6**: p. 167-9.
77. Kuhnle, U., et al., Transient pseudohypoaldosteronism in obstructive renal disease with transient reduction of lymphocytic aldosterone receptors. Results in two affected infants. *Horm Res*, 1993. **39**(3-4): p. 152-5.
78. Kuhnle, U., S. Lewicka, and P.J. Fuller, Endocrine disorders of sodium regulation. Role of adrenal steroids in genetic defects causing sodium loss or sodium retention. *Horm Res*, 2004. **61**(2): p. 68-83.
79. Kuhnle, U., et al., Pseudohypoaldosteronism in eight families: different forms of inheritance are evidence for various genetic defects. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990. **70**(3): p. 638-41.
80. Kuhnle, U., et al., The effects of long-term normalization of sodium balance on linear growth in disorders with aldosterone deficiency. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1983. **102**(4): p. 577-82.
81. Lavery, G.G., et al., Late-onset apparent mineralocorticoid excess caused by novel compound heterozygous mutations in the HSD11B2 gene. *Hypertension*, 2003. **42**(2): p. 123-9.
82. Li, A., et al., Molecular basis for hypertension in the "type II variant" of apparent mineralocorticoid excess. *Am J Hum Genet*, 1998. **63**(2): p. 370-9.
83. Li, J.H., E.J. Cragoe, Jr., and B. Lindemann, Structure-activity relationship of amiloride analogs as blockers of epithelial Na channels: I. Pyrazine-ring modifications. *J Membr Biol*, 1985. **83**(1-2): p. 45-56.
84. Li, J.H., E.J. Cragoe, Jr., and B. Lindemann, Structure-activity relationship of amiloride analogs as blockers of epithelial Na channels: II. Side-chain modifications. *J Membr Biol*, 1987. **95**(2): p. 171-85.
85. Lifton, R.P., Genetic determinants of human hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(19): p. 8545-51.
86. Lifton, R.P., A.G. Gharavi, and D.S. Geller, Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*, 2001. **104**(4): p. 545-56.
87. Light, D.B., et al., Amiloride-sensitive cation channel in apical membrane of inner medullary collecting duct. *Am J Physiol*, 1988. **255**(2 Pt 2): p. F278-86.
88. Lindemann, B., Fluctuation analysis of sodium channels in epithelia. *Annu Rev Physiol*, 1984. **46**: p. 497-515.
89. Lindemann, B. and W. Van Driessche, Sodium-specific membrane channels of frog skin are pores: current fluctuations reveal high turnover. *Science*, 1977. **195**(4275): p. 292-4.
90. Ling, B.N., C.F. Hinton, and D.C. Eaton, Amiloride-sensitive sodium channels in rabbit cortical collecting tubule primary cultures. *Am J Physiol*, 1991. **261**(6 Pt 2): p. F933-44.

-
91. Lingueglia, E., et al., Cloning of the amiloride-sensitive FMRFamide peptide-gated sodium channel. *Nature*, 1995. **378**(6558): p. 730-3.
 92. Locher, K.P., A.T. Lee, and D.C. Rees, The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, 2002. **296**(5570): p. 1091-8.
 93. Ludwig, M., et al., Common polymorphisms in genes encoding the human mineralocorticoid receptor and the human amiloride-sensitive sodium channel. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1998. **64**(5-6): p. 227-30.
 94. Luft, F.C., Molecular genetics of salt-sensitivity and hypertension. *Drug Metab Dispos*, 2001. **29**(4 Pt 2): p. 500-4.
 95. Luft, F.C., et al., Influence of genetic variance on sodium sensitivity of blood pressure. *Klin Wochenschr*, 1987. **65**(3): p. 101-9.
 96. Luft, F.C., et al., Mendelian hypertension with brachydactyly as a molecular genetic lesson in regulatory physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. **285**(4): p. R709-14.
 97. Macknight, A.D., D.R. DiBona, and A. Leaf, Sodium transport across toad urinary bladder: a model "tight" epithelium. *Physiol Rev*, 1980. **60**(3): p. 615-715.
 98. Macknight, A.D. and A. Leaf, Regulation of cellular volume. *Physiol Rev*, 1977. **57**(3): p. 510-73.
 99. Mansfield, T.A., et al., Multilocus linkage of familial hyperkalaemia and hypertension, pseudohypoaldosteronism type II, to chromosomes 1q31-42 and 17p11-q21. *Nat Genet*, 1997. **16**(2): p. 202-5.
 100. Mastroberardino, L., et al., Ras pathway activates epithelial Na⁺ channel and decreases its surface expression in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell*, 1998. **9**(12): p. 3417-27.
 101. Matalon, S., et al., Immunocytochemical and functional characterization of Na⁺ conductance in adult alveolar pneumocytes. *Am J Physiol*, 1992. **262**(5 Pt 1): p. C1228-38.
 102. McDonald, F.J. and M.J. Welsh, Binding of the proline-rich region of the epithelial Na⁺ channel to SH3 domains and its association with specific cellular proteins. *Biochem J*, 1995. **312** (Pt 2): p. 491-7.
 103. McGraw, D.W., et al., Polymorphisms of the 5' leader cistron of the human beta2-adrenergic receptor regulate receptor expression. *J Clin Invest*, 1998. **102**(11): p. 1927-32.
 104. Meisler, M.H., et al., SCNN1, an epithelial cell sodium channel gene in the conserved linkage group on mouse chromosome 6 and human chromosome 12. *Genomics*, 1994. **24**(1): p. 185-6.
 105. Miesfeld, R., et al., Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA. *Cell*, 1986. **46**(3): p. 389-99.
 106. Morrison, N., et al., Regional chromosomal assignment of the human mineralocorticoid receptor gene to 4q31.1. *Hum Genet*, 1990. **85**(1): p. 130-2.
 107. Nagel, G., et al., Non-specific activation of the epithelial sodium channel by the CFTR chloride channel. *EMBO Rep*, 2001. **2**(3): p. 249-54.
 108. Naray-Fejes-Toth, A. and G. Fejes-Toth, The *sgk*, an aldosterone-induced gene in mineralocorticoid target cells, regulates the epithelial sodium channel. *Kidney Int*, 2000. **57**(4): p. 1290-4.
 109. Navar, L.G., et al., Renal responses to AT1 receptor blockade. *Am J Hypertens*, 2000. **13**(1 Pt 2): p. 45S-54S.
 110. Oberfield, S.E., et al., Pseudohypoaldosteronism: multiple target organ unresponsiveness to mineralocorticoid hormones. *J Clin Endocrinol Metab*, 1979. **48**(2): p. 228-34.
 111. O'Connor, D.T., et al., Early alteration in glomerular reserve in humans at genetic risk of essential hypertension: mechanisms and consequences. *Hypertension*, 2001. **37**(3): p. 898-906.
 112. Oh, Y.S., S. Saxena, and D.G. Warnock, AlphaENaC: leading the charge. *J Clin Invest*, 1999. **104**(7): p. 849-50.

-
113. Palmer, L.G., Epithelial Na channels: function and diversity. *Annu Rev Physiol*, 1992. **54**: p. 51-66.
 114. Palmer, L.G., et al., Expression of epithelial Na channels in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol*, 1990. **96**(1): p. 23-46.
 115. Palmer, L.G. and G. Frindt, Amiloride-sensitive Na channels from the apical membrane of the rat cortical collecting tubule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(8): p. 2767-70.
 116. Palmer, L.G. and G. Frindt, Gating of Na channels in the rat cortical collecting tubule: effects of voltage and membrane stretch. *J Gen Physiol*, 1996. **107**(1): p. 35-45.
 117. Palmer, L.G., H. Sackin, and G. Frindt, Regulation of Na⁺ channels by luminal Na⁺ in rat cortical collecting tubule. *J Physiol*, 1998. **509 (Pt 1)**: p. 151-62.
 118. Park, J., et al., Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *Embo J*, 1999. **18**(11): p. 3024-33.
 119. Pasalic, D., et al., Association of two genetic variations of lipoprotein lipase, S447X and Hind III, with coronary artery disease and hypertriglyceridemia. *Coll Antropol*, 2006. **30**(3): p. 549-54.
 120. Pickart, C.M., Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 2001. **70**: p. 503-33.
 121. Qi, J., et al., Regulation of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel by syntaxin 1A. *J Biol Chem*, 1999. **274**(43): p. 30345-8.
 122. Reihnsaus, E., et al., Mutations in the gene encoding for the beta 2-adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1993. **8**(3): p. 334-9.
 123. Renard, S., et al., Biochemical analysis of the membrane topology of the amiloride-sensitive Na⁺ channel. *J Biol Chem*, 1994. **269**(17): p. 12981-6.
 124. Rocchini, A.P., et al., The effect of weight loss on the sensitivity of blood pressure to sodium in obese adolescents. *N Engl J Med*, 1989. **321**(9): p. 580-5.
 125. Rosler, A., The natural history of salt-wasting disorders of adrenal and renal origin. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984. **59**(4): p. 689-700.
 126. Rossier, B.C., et al., Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors. *Annu Rev Physiol*, 2002. **64**: p. 877-97.
 127. Rotin, D., et al., An SH3 binding region in the epithelial Na⁺ channel (alpha rENaC) mediates its localization at the apical membrane. *Embo J*, 1994. **13**(19): p. 4440-50.
 128. Sariban-Sohraby, S., et al., Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channels reconstituted into planar lipid bilayer membranes. *Nature*, 1984. **308**(5954): p. 80-2.
 129. Saxena, A., et al., Novel mutations responsible for autosomal recessive multisystem pseudohypoaldosteronism and sequence variants in epithelial sodium channel alpha-, beta-, and gamma-subunit genes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(7): p. 3344-50.
 130. Saxena, S., et al., Interaction of syntaxins with the amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *J Biol Chem*, 1999. **274**(30): p. 20812-7.
 131. Schaedel, C., et al., Lung symptoms in pseudohypoaldosteronism type 1 are associated with deficiency of the alpha-subunit of the epithelial sodium channel. *J Pediatr*, 1999. **135**(6): p. 739-45.
 132. Schiffman, S.S., E. Lockhead, and F.W. Maes, Amiloride reduces the taste intensity of Na⁺ and Li⁺ salts and sweeteners. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. **80**(19): p. 6136-40.
 133. Schild, L., et al., Identification of amino acid residues in the alpha, beta, and gamma subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) involved in amiloride block and ion permeation. *J Gen Physiol*, 1997. **109**(1): p. 15-26.
 134. Schmidt, H., et al., Clinical, biochemical and molecular genetic data in five children with Gitelman's syndrome. *Horm Metab Res*, 2001. **33**(6): p. 354-7.
 135. Schmidt, R.F.H.L., F (Hrsg.); Thews, G (Hrsg.), *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Vol. 29. 2005, Heidelberg: Springer Medizin Verlag
 136. Schultz, S.G., A century of (epithelial) transport physiology: from vitalism to molecular cloning. *Am J Physiol*, 1998. **274**(1 Pt 1): p. C13-23.

-
137. Shi, H., et al., Interactions of beta and gamma ENaC with Nedd4 can be facilitated by an ERK-mediated phosphorylation. *J Biol Chem*, 2002. **277**(16): p. 13539-47.
 138. Shimkets, R.A., R.P. Lifton, and C.M. Canessa, The activity of the epithelial sodium channel is regulated by clathrin-mediated endocytosis. *J Biol Chem*, 1997. **272**(41): p. 25537-41.
 139. Simon, D.B., et al., Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet*, 1996. **12**(1): p. 24-30.
 140. Snyder, P.M., et al., Membrane topology of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *J Biol Chem*, 1994. **269**(39): p. 24379-83.
 141. Snyder, P.M., D.R. Olson, and B.C. Thomas, Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *J Biol Chem*, 2002. **277**(1): p. 5-8.
 142. Spindler, B. and F. Verrey, Aldosterone action: induction of p21(ras) and fra-2 and transcription-independent decrease in myc, jun, and fos. *Am J Physiol*, 1999. **276**(5 Pt 1): p. C1154-61.
 143. Staub, O., et al., WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *Embo J*, 1996. **15**(10): p. 2371-80.
 144. Stokes, J.B., Physiologic resistance to the action of aldosterone. *Kidney Int*, 2000. **57**(4): p. 1319-23.
 145. Strautnieks, S.S., et al., Localisation of pseudohypoaldosteronism genes to chromosome 16p12.2-13.11 and 12p13.1-pter by homozygosity mapping. *Hum Mol Genet*, 1996. **5**(2): p. 293-9.
 146. Tavernarakis, N. and M. Driscoll, Molecular modeling of mechanotransduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Physiol*, 1997. **59**: p. 659-89.
 147. Timmermann, B., et al., Beta-2 adrenoceptor genetic variation is associated with genetic predisposition to essential hypertension: The Bergen Blood Pressure Study. *Kidney Int*, 1998. **53**(6): p. 1455-60.
 148. Vallet, V., et al., An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature*, 1997. **389**(6651): p. 607-10.
 149. Vallet, V., J.D. Horisberger, and B.C. Rossier, Epithelial sodium channel regulatory proteins identified by functional expression cloning. *Kidney Int Suppl*, 1998. **67**: p. S109-14.
 150. Verrey, F., Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport. *Am J Physiol*, 1999. **277**(3 Pt 2): p. F319-27.
 151. Verrier, B., et al., Identification and properties of a novel type of Na⁺-permeable amiloride-sensitive channel in thyroid cells. *Eur J Biochem*, 1989. **183**(3): p. 499-505.
 152. Vigne, P., et al., A new type of amiloride-sensitive cationic channel in endothelial cells of brain microvessels. *J Biol Chem*, 1989. **264**(13): p. 7663-8.
 153. Voilley, N., et al., The lung amiloride-sensitive Na⁺ channel: biophysical properties, pharmacology, ontogenesis, and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(1): p. 247-51.
 154. Waldmann, R., et al., A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature*, 1997. **386**(6621): p. 173-7.
 155. Will, P.C., et al., Amiloride-sensitive salt and fluid absorption in small intestine of sodium-depleted rats. *Am J Physiol*, 1985. **248**(1 Pt 1): p. G133-41.
 156. Williams, R.R., et al., Multigenic human hypertension: evidence for subtypes and hope for haplotypes. *J Hypertens Suppl*, 1990. **8**(7): p. S39-46.
 157. Wilson, R.C., S. Nimkarn, and M.I. New, Apparent mineralocorticoid excess. *Trends Endocrinol Metab*, 2001. **12**(3): p. 104-11.
 158. Yuan, X.J., et al., Molecular basis and function of voltage-gated K⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 1998. **274**(4 Pt 1): p. L621-35.

VII. DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. H. Schmidt für die Bereiterklärung, mich bei dieser Dissertation zu betreuen, seine Hilfsbereitschaft zu einem Zeitpunkt, als ich keinen Ausweg mehr sah, seine stetige Unterstützung und Beratung und für die Durchsicht und Korrektur der Arbeit, an deren Gelingen er einen sehr großen Anteil hat.

Bei Frau Dr. Dr. C. Nevinny-Stickel-Hinzpeter und ihren Mitarbeiterinnen möchte ich mich sehr für die freundliche Bereitstellung nicht nur einiger technischer Geräte und Materialien in den Räumlichkeiten ihrer Humangenetischen Praxis danken, sondern auch und vor allem für die mir gegenüber aufgebrachte Freundlichkeit und Geduld, sowie die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente.

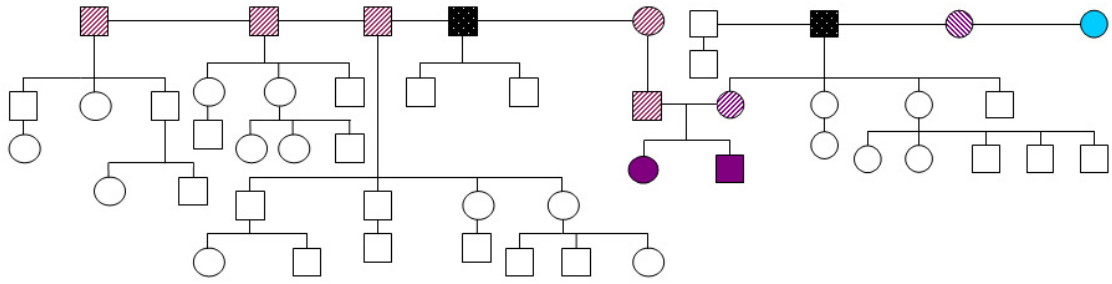
Den Angehörigen der beiden Indexpatienten danke ich für die freundliche Bereiterklärung, sich für unsere Untersuchungen zur Verfügung zu stellen.

Für die Auswertung meiner laborchemischen Proben bin ich Frau Keller aus der Poliklinik der LMU und Frau Dr. S. Lewicka vom Biochemischen Institut der Universität Heidelberg zu großem Dank verpflichtet.

Frau R. Hollweck vom IBE der TU München sowie Herr F. Burckhardt hatten großen Anteil an der Erstellung der statistischen Auswertung unserer Ergebnisse, wofür ich ihnen sehr dankbar bin.

Meinem Nachbarn, Herrn Dr. M. Schröder verdanke ich nicht nur einen großen Teil der Formatierung dieser Arbeit, sondern ich möchte ihm ebenso für seine unermüdliche Geduld und seinen Ideenreichtum bei der Lösung technischer Probleme meinen Dank aussprechen.

Für all seine Hilfe und die Mühe, die er sich gemacht hat, um mich bei der endgültigen Fertigstellung der Arbeit zu unterstützen, möchte ich meinem Freund Christoph Baumann ganz besonders danken.



-  Heterozygot
-  Homozygot krank
-  Homozygot gesund
-  Genotyp unbekannt
-  Verstorben
-  Männlich
-  Weiblich

Abb. 33: Stammbaum der Indexfamilie

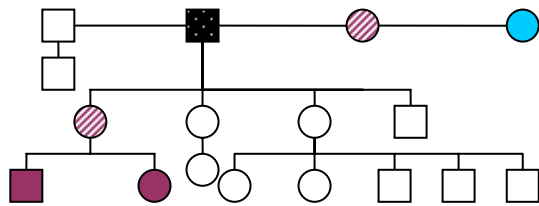


Abb. 34: Stammbaum der Mutter

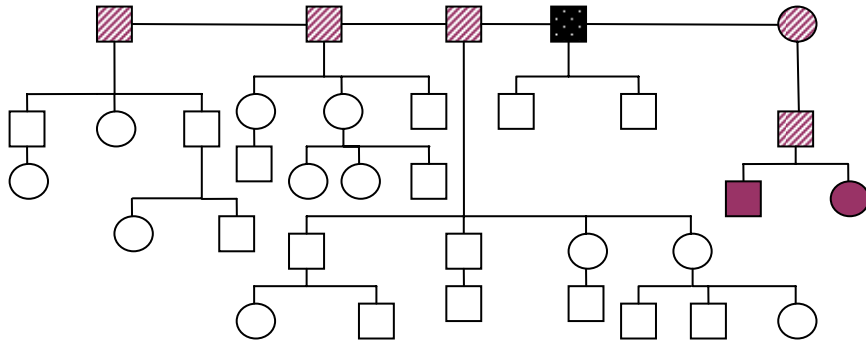


Abb. 35: Stammbaum des Vaters

-  Heterozygot
-  Homozygot krank
-  Homozygot gesund
-  Genotyp unbekannt
-  Verstorben
-  Männlich
-  Weiblich

2. Tabellen

<u>1.Persönliche Daten:</u>								
Probandnummer	1	2	3	4	5	6	7	8
Alter	53 (04.06.48)	67 (31.01.34)	68 (31.01.34)	74 (20.01.28)	52 (09.10.49)	69 (06.06.32)	75 (12.05.26)	78 (05.12.23)
Geschlecht	m	M	m	m	w	w	w	w
prämenopausal					ja			
postmenopausal						ja	ja	ja
Größe (cm)	189	182	176	176	169,5	170	160	164,8
Gewicht (kg)	81,1	75-77	73	74	89	57	60	70
BMI	22,7	22,9	23,6	23,9	30,8	19,7	23,4	25,7
Sportliche Aktivitäten	kaum	Wandern, Paddelboot	Schwimmen Radfahren	Skifahren, Wandern	2x30min. Aerobic/ Woche	Wandern	Wandern	nein
<u>2.Untersuchungs- befunde</u>	1	2	3	4	5	6	7	8
Ruhezeit	30 min.	30 min.	30 min.	30 min.	30 min.	30 min.	30 min.	30 min.
Blutdruck vor der Ruhezeit (mmHg)	145/86	164/94	170/100	155/74 bzw. 160/80	145/80	125/59	138/72	165/83
nachher (mmHg)	130/79	148/82	170/100	130/75	138/76	123/56	137/70	155/73
MAP vorher (mmHg)	106	117	123	101 bzw. 107	102	81	94	110
nachher (mmHg)	96	104	123	93	97	78	92	100
Herzfrequenz vorher	72/min.	88/min.	76/min.	70/min.	106/min.	68/min.	73/min.	90/min.
nachher	68/min.	69/min.	68/min.	64/min.	81/min.	68/min.	68/min.	73/min.
<u>3.Risikofaktoren für Hypertonie</u>	1	2	3	4	5	6	7	8
Raucher	nein	ja (mäßig Pfeife)	ja	nein	nein	ja	ja	nein
Hormonsubstitution					nein	ja	nein	nein

chron. Krankheiten		Nein	Glaukom	leichte Hypertonie			grauer Star, Infarkt im re. Auge	grüner und grauer Star
Medikamente	(Magnesium, Vit.C)		Augentropfen	Co-Diovan (Atll-Rez.Hemmer)		β-Blocker nach Bedarf	β-Blocker, Iscover, Osteoporosemed.	(Augentropfen)
Coffeinkonsum	nein	4 Tassen/d	2 Tassen/d	6Tassen/d	3-4 Tassen/d	1-2 Tassen/d	4Tassen/d	
Alkoholkonsum	nein	1,5L Bier/d, gelegentlich Wein	regelmäßig, eher wenig	"sehr mässig", 1Schnaps/d	nein	fast nicht	nein	
<u>4.Bemerkungen</u>	Im Jahr 2000 Radiojodtherapie (keine SD-Medikamente)	Blutdruckmessungen über 2-3 Monate vorhanden (o.B)	Diphtherie im Kindesalter	Asthma in der Pubertät	Als Kind Tonsillitis, sehr niedriger Blutdruck als Kind	Als Kind Hals-Lymphdrüsen-Tbc, Duodenalulcera (ausgeheilt)	Lyme-Borreliose, Total-OP, in letzter Zeit Tachykardien	
<u>5.Laborchemische Befunde</u>	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>EDTA-Blut:</i>								
PRA (Al/ml/h)	0,9	1,3	0,76	3	1,8	0,6	0,1	0,26
Aldosteron (ng/dl)	6,2	11,5	5,8	<1,0	9,5	3,7	9	2,8
18-OH-Cortisol (ng/dl)	22	99	138	41	57	58	69	10
18-OH-B	24,6	79,2	53,6	18	39	18	22,5	10,3
<i>Blutserum:</i>								
Elektrolyte: Na (mmol/L)	140,1	142	139	126,2	139,4	141,1	142	142
K (mmol/L)	4,56	4,49	n.m.	n. m.	5,21	4,5	4,34	4,63
Cl (mmol/L)	108	108	106	105	105	110	109	112
Ca (mmol/L)	2,46	2,3	2,28	2,24	2,28	2,32	2,33	2,41
Blutfette: Cholesterin (mg/dl)	244	245	352	224	206	n.m., da nicht nüchtern	n.m., da nicht nüchtern	283
Triglyceride	78	178	332	185	152	n.m., da nicht nüchtern	n.m., da nicht nüchtern	77
24h-Sammelurin: Gesamtmenge [56]	3100	4100	3700	2500	3300	1750	1300	2200
Aldosteron-ER (ng/dl)	7,9	25,42	61,69	14,25	16,7	7,35	4,42	2,6
Elektrolyte: Na (mmol/L)	105,4	56,4	134,8	84,1	76,2	69,7	98,1	121,9
K (mmol/L)	28,15	13,83	82,88	36,88	37,52	26,39	19,71	28,59

Ca (mmol/L)	2,48	1,07	4,35	0,29	0,81	2,22	4,94	1,69
Mineralocorticoide: TH-Aldosteron (µg/24h)	73	209,1	266,4	80	76	31,5	31,2	41
Fr 18-OH-B (µg/24h)	7,1	13,94	45,14	8,5	10	3,15	2,99	4,4
Fr. 18-OH-Cortisol (µg/24h)	120	422,3	1235,8	125	118	108,5	75,4	58

Tab. 12: Untersuchungsbefunde der Probanden, (Anamnese, klinische und laborchemische Untersuchungen); n.m. = nicht messbar, hellblau markiert die homozygot Gesunde

□: Männliche Probanden, □: weibliche Probanden

gemessener Wert	Probandennummer								NORM [118]	NORM (max)	Einheit
	1	2	3	4	5	6	7	8			
Aldosteron	6,2	11,5	5,8	1	9,5	3,7	9	2,8	6	30	ng/dl
18-OH-Cortisol	22	99	138	41	57	58	69	10	3,1	18	ng/dl
18-OH-B	24,6	79,2	53,6	18	39	18	22,5	10,3	23	145	ng/dl
Aldosteron-ER	7,9	25,42	61,69	14,25	16,7	7,35	4,42	2,6	2,8	30	µg/24h
Aldosteron-ER	0,24	1,04	2,28	0,36	0,56	0,13	0,06	0,06	3,5	17,5	µg/24h
TH-Aldosteron	73	209,1	266,4	80	76	31,5	31,7	41	10	70	µg/24h
FR.18-OH-B	7,1	13,94	45,14	8,5	10	3,15	2,99	4,4	1,5	6,5	µg/24h
FR.18-OH-Cortisol	120	422,3	1235,8	125	118	108,5	75,4	58	0,2	1,8	µg/24h
Urinmenge	3,1	4,1	3,7	2,5	3,3	1,75	1,3	2,2			l
Blutdruck (MAP)	96	104	123	93	97	78	92	100	92,3	105,7	mmHg

Tab. 13: Laborwerte der Probanden (EDTA-Blut, Blutserum und Sammel-Urin), hellblau markiert die homozygot Gesunde

□: Männliche Probanden, □: weibliche Probanden

Stadieneinteilung	Systolischer Wert	Diastolischer Wert	Mittlerer arterieller Druck (MAP)	Einheit
Optimal	< 120	< 80	93,3	mmHg
Normal	< 130	< 85	100	mmHg
„noch“ normal	130 - 139	85 - 89	100 – 105,7	mmHg
Grenzwerthypertonie	140 – 149	90 – 94	106,7 – 112,3	mmHg
Hypertonie (Grad I)	140 – 159	90 – 99	106,7 - 119	mmHg
Mittelschwere Hypertonie (Grad II)	160 – 179	100 - 109	120 – 132,3	mmHg
Schwere Hypertonie (Grad III)	> 180	> 110	> 133,3	mmHg

Tab 14: Einteilung der Hypertoniestadien nach WHO/ISH Guidelines 1999

Nach: Classen, Diehl, Kochsiek 2004

gemessener Wert	Referenzbereich	Einheit
<i>EDTA-Blut:</i>		
PRA	0,2 - 2,8	ng/ml/h
Aldosteron	2,0 - 14,0	ng/dl
18-OH-Cortisol	43 - 224	ng/dl
18-OH-B	23 - 145	ng/dl
<i>Blutserum:</i>		
Elektrolyte: Natrium	135 - 145	mmol/l
Kalium	3,5 - 5	mmol/l
Chlorid	95 - 110	mmol/l
Calcium	2,15 - 2,6	mmol/l
Blutfette: Cholesterin	140 - 240	mg/dl
Triglyceride	70 - 200	mg/dl
<i>24h-Sammelurin:</i>		
Aldosteron-ER	2,8 - 30	µg/24h
Elektrolyte: Natrium	50 - 200	mmol/24h
Kalium	30 - 100	mmol/24h
Calcium	7,5 m; 6,2 w	mmol/24h
Mineralocorticoide: TH-Aldosteron	10 - 70	µg/24h
Fr 18-OH-B	1,5 - 6,5	µg/24h
Fr. 18-OH-Cortisol	50 - 150	µg/24h

Tab. 15: Referenzbereiche der Laborwerte

3. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Julia Jückstock
Hochfeld 21 b
82343 Pöcking
Tel: 089-38898989
Mobil: 0176-24086909
eMail: julia.jueckstock@med.uni-muenchen.de
Geboren am 13. April 1977 in München

Schulbildung:

1983-1988 Grund und Hauptschule Maria-Montessori, Starnberg
1988-1992 Städtisches Luisengymnasium München
1992-1997 Gymnasium Starnberg
Mai 1997: Abitur

Medizinische Ausbildung:

1997-1998 Krankenpflegeausbildung im
Krankenhaus der Missions-Benediktinerinnen Tutzing e.V.

Studium:

1998-2005 Ludwig-Maximilians-Universität München
Oktober 2005: Approbation

Famulaturen:

2000 Gynäkologie
Klinikum Traunstein, Kreiskliniken Traunstein-Trostberg GmbH,
Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe

2002 Kinderchirurgie
Klinikum St. Marien, Landshut

2002 Humangenetik
Praxis Dr. med. Dr. rer. nat. Nevinny-Stickel-Hinzpeter, München

2003 Gynäkologie
St. Thomas Hospital, Changanassery, Kerala, Indien

2005 Gynäkologie
Krankenhaus des BRK, Taxisstrasse, München

Praktisches Jahr:

2004-2005

Chirurgie Instituto Medicinal de Seguro Social, Monclova, Coahuila, Mexiko

Innere Medizin Kantonsspital St. Gallen, Schweiz

Gynäkologie I. Universitätsfrauenklinik der LMU, München,
Klinikum Traunstein, Kreiskliniken Traunstein-Trostberg GmbH,
Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe

Ärztliche Tätigkeit:

Seit 2005 Gynäkologie und Geburtshilfe
I. Universitätsfrauenklinik, Klinikum Innenstadt, München
Direktor: Prof. Dr. med. K. Friese

München, 26. März 2007