

# **Habilitationsschrift**

**aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV**

**Klinikum der Universität München**

**Direktor: Professor Dr. med. Martin Reincke**

**Molekulare Mechanismen der autonomen**

**Aldosteronproduktion**

vorgelegt von

Dr.med. Dr. nat. med. Urs Daniel Lichtenauer

2018

für Julia-Kristina

## **Danksagung**

Zu allererst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Felix Beuschlein bedanken, meinem langjährigen Lehrer, Mentor, Team- und Laborleiter, der mich über viele Jahre beruflich und persönlich begleitet und geprägt hat. Durch seine vorbildlich kontinuierliche Motivation, Förderung und freundschaftliche Unterstützung wurde meine aktuelle berufliche Entwicklung überhaupt erst möglich.

Ebenso möchte ich Herrn Professor Dr. Martin Reincke für die Vorgaben, Empfehlungen und Informationen zu wissenschaftlicher und beruflicher Ausrichtung danken. Diese eröffneten mir Perspektiven und halfen mir, meinen Weg zu finden.

Auch dem Laborteam gilt mein herzlicher Dank, insbesondere Herrn Igor Shapiro und Frau Brigitte Mauracher. Durch beständiges und ausdauerndes Mitwirken garantierten sie die erfolgreiche Durchführung meiner Projekte.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Frau Julia-Kristina und meinen Kindern, die trotz aller privaten Einschränkungen mein wissenschaftliches Arbeiten und meine berufliche Weiterentwicklung uneingeschränkt weiter fördern und mir stets liebevoll zur Seite stehen.

Nicht zuletzt gebührt meinen Eltern Maxi und Peter, die meinen Lebensweg stets begleiten, ein besonderer Dank für ihre wertvollen Ratschläge und immerwährende Unterstützung.

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	- 1 -
1.1 Klinische Grundlagen.....	- 1 -
1.2 Molekulare Ausgangssituation.....	- 2 -
2 Ungeklärte Fragen und der Beitrag der eigenen Arbeiten .....	- 4 -
3 Eigene Forschung zum Thema .....	- 6 -
3.1 Physiologische Mechanismen bei der autonomen Aldosteronproduktion .....	- 6 -
3.2 NCI H295R Zelllinie als Modell für den primären Hyperaldosteronismus .....	- 8 -
3.3 Kaliumabhängige Änderungen des Transkriptoms im Tiermodell.....	- 10 -
3.4 Adrenale Transkriptionsfaktoren .....	- 14 -
3.5 Mutierte Ionenkanäle und Störung der elektrophysiologischen Homöostase .....	- 18 -
4 Schlussfolgerung und Ausblick.....	- 23 -
5 Literaturverzeichnis .....	- 28 -
6 Auflistung der eigenen Publikationen dieser Habilitationsschrift.....	- 34 -

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinische Grundlagen

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System reguliert das intravasale Flüssigkeitsvolumen und die Plasma-Elektrolytkonzentrationen. Die Plasma-Aldosteronkonzentration ist assoziiert mit kardiovaskulären Erkrankungen, wie Schlaganfall, Myokardinfarkt, Vorhofflimmern und gestörter linksventrikulärer Funktion<sup>49,55,71</sup>, und wird auch als kardiovaskulärer Risikofaktor betrachtet. Eine pathologisch erhöhte, autonome Aldosteronsekretion ist bei ca. 6 % aller Hypertoniker und bei bis zu 20% der Patienten mit therapierefraktärer arterieller Hypertonie nachweisbar. Der Aldosteronexzess ist damit die häufigste Ursache einer chirurgisch behandelbaren sekundären Hypertonie<sup>27,31</sup>. Ursächlich liegen eine bilaterale adrenale Hyperplasie (BAH) in 40 – 60 % und ein unilaterales Aldosteron produzierendes Adenom (APA) in 43 – 52 % aller Fälle vor<sup>49,61</sup>. Familiäre Formen des Hyperaldosteronismus (ca. 1 %), adrenokortikale Karzinome mit relevanter Aldosteronproduktion, oder eine ektope Aldosteronproduktion (< 1 %) sind dagegen sehr selten. Die von Jerome W. Conn initial definierte typische Trias aus Hypertonie, Hypokaliämie und Alkalose kommt nur bei einem klinisch sehr ausgeprägten Hyperaldosteronismus vor und lässt sich mittlerweile bei nur ca. 1 % der Hypertoniker feststellen<sup>24</sup>. Eine isolierte Hypokaliämie liegt in 9 – 37 % der Conn-Fälle vor. Die milden, normokaliämischen Hyperaldosteronismusformen sind somit am häufigsten, aufgrund der nur gering ausgeprägten oder gar fehlenden Klinik aber viel schwerer zu diagnostizieren. Frühzeitiges Erkennen und effektives Behandeln der Erkrankung sind jedoch essentiell, führt die Therapie doch nachweislich zu einer Reduktion kardiovaskulärer und metabolischer Komorbiditäten und der Mortalität<sup>59,77</sup>.

APA werden vorzugsweise mittels unilateraler Adrenalectomie therapiert, während bei Inoperabilität oder bei BAH die medikamentöse Therapie mit einem Mineralkortikoidantagonisten Mittel der ersten Wahl ist<sup>29</sup>.

In den letzten Jahren haben sich die Konzepte der molekularen Mechanismen und somit die Theorien zur Pathogenese des primären Hyperaldosteronismus erheblich verändert. Diese sind nun Grundlage für die Erforschung neuer Therapieformen.

### *1.2 Molekulare Ausgangssituation*

Aldosteron ist ein Mineralkortikoid und wird in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde produziert. Es ist in den Renin-Angiotensin-Aldosteron Regelkreis eingebunden und somit maßgeblich für die Salzhomöostase im Körper verantwortlich. Hauptstimulatoren der physiologischen Aldosteronfreisetzung sind neben Angiotensin II (über den AT1 Rezeptor) adrenocorticotrophes Hormon (ACTH, über den MC2-Rezeptor) und Kalium ( $K^+$ ), die jeweils direkt oder indirekt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in den Zona glomerulosa Zellen führen.

Calcium ( $Ca^{2+}$ ) ist einer der am weitesten verbreiteten ‚Second Messenger‘ in der zellulären Signalkaskade und wirkt vor allem über den Calciumsensor Calmodulin (CaM), der durch steigende intrazelluläre Calciumkonzentration aktiviert wird. Diese kommen durch spannungsabhängige, membranständige Ionenkanäle oder Calcium-gesteuerte Rezeptoren oder aus intrazellulären Speichern zu Stande. In der Folge werden CaM-abhängige Kinasen (CaMK) aktiviert<sup>72</sup>. Die meisten Mitglieder der CaMK-Familie sind multifunktionelle Enzyme, involviert in einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Gentranskription, Zellüberleben, und Reorganisation des Zytoskeletts<sup>72</sup>. Die Aktivität der CaMK wird über Phosphorylierung reguliert, für die CaMKinasen-Kinasen verantwortlich sind<sup>68</sup>. Die subzelluläre Lokalisation der

CaMKinasen hängt von ihrem Phosphorylierungsgrad ab und ist somit Ausdruck ihrer Aktivität<sup>19,34</sup>.

Angiotensin II wirkt nach Bindung an einen Typ1-Rezeptor (AT1) beispielsweise über die Aktivierung der Phospholipase C und Produktion von Diacylglycerol und Inositol Triphosphat, worauf über mehrere Signalwege intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher entleert werden. Besonders sensitiv reagieren die Zellen der Zona glomerula auf Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration. Steigt diese an, kommt den KCNK Kanälen, einschließlich der TWIK-related acid sensitive  $\text{K}^+$  1 und 3 (TASK 1 und TASK 3) Kanäle, eine besondere Bedeutung zu<sup>52</sup>, über die eine Depolarisation der Zelle erfolgt, was die Aktivierung spannungsabhängiger T-Typ Calciumkanäle und damit ebenfalls eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach sich zieht<sup>45</sup>. Die erhöhte CaM-Aktivität löst die Aktivierung der CaMKinasen I und IV aus, die wiederum die Aktivität wichtiger Transkriptionsfaktoren wie cAMP response element-binding protein (CREB), nerve growth factor induced clone B (NGFIB) oder Nur related factor 1 (NURR1) erhöht. Diese besitzen Bindungsstellen auf dem Promotor des Aldosteronsynthase-Gens (*CYP11B2*), nach dessen Synthese eine gesteigerte Umwandlung von 11-Deoxycorticosteron zu Aldosteron resultiert<sup>9,10,23,45,58</sup>. Eine schematische Zusammenfassung findet sich in Abbildung 1.

Im Gegensatz zu der gut untersuchten physiologischen Aldosteronproduktion sind die Mechanismen der pathologischen Aldosteronfreisetzung in APA weit weniger erforscht. Es gab mehrere Hinweise auf genetische Ursachen: Zum einen wurde in der Framingham Heart Study eine hereditäre Aldosteronvariabilität von 11 % festgestellt<sup>50</sup>. Darüber hinaus bewirken Mutationen am Mineralkortikoidrezeptor<sup>75</sup> erhöhte Aldosteronkonzentrationen. Außerdem führten Alterationen an Ionenkanälen der Zellmembran, die für die



in wie weit die bekannten molekularen Mechanismen der physiologischen Aldosteronproduktion auch bei humanen APA aktiv sind<sup>62</sup>. Für *in vitro* Untersuchungen bedarf es geeigneter Zellen, jedoch haben alle existierenden Zelllinien zur Erforschung des Hyperaldosteronismus ihre Limitationen. Wir bedienten uns der humanen Nebennierenkarzinomzelllinie NCI H295R, die neben einer Cortisol- auch eine Aldosteronproduktion aufweist, und untersuchten sie im Detail auf ihre Eignung als Modell der autonomen Aldosteronproduktion in unserem Labor<sup>44</sup>. *In vivo* suchten wir nach bisher unbekannt regulierten Genen, indem wir das Nebennierentranskriptom im Mausmodell nach unterschiedlicher Kaliumexposition mittels Microarray analysierten. Die resultierenden Kandidatengene wurden anschließend *in vitro* an NCI H295R Zellen sowie an humanen Aldosteron produzierenden Adenomen überprüft<sup>26</sup>.

Es gibt Hinweise, dass auch in APA eine abnorme Regulation von Transkriptionsfaktoren oder Genen, die in Stammzellen während der Embryonalentwicklung exprimiert werden, pathophysiologisch bedeutsam sein können. Wir untersuchten den für die adulte Nebenniere bisher unbekannt Transkriptionsfaktor Pbx1 genauer und ordneten ihn unter Berücksichtigung der etablierten Transkriptionsfaktoren der Nebenniere ein<sup>43</sup>.

Neuere Methoden, wie die Exom-Sequenzierung, erlauben die Identifizierung überzufällig häufig auftretender genetische Veränderungen zwischen den eingesetzten Proben. Mit dieser Methode konnte im Verständnis über die Pathogenese humaner APA 2011 ein Durchbruch erzielt werden, als gezeigt wurde, dass in über 30 % der Fälle somatische Mutationen am KCNJ5-Gen, das für einen Kaliumkanal der Zellmembran kodiert, nachweisbar sind, die sich durch Änderungen der Elektrophysiologie als krankheitsverursachend herausstellten<sup>22</sup>. Wir entwickelten daraufhin ein transgenes

Mausmodell zur nebennierenspezifischen Expression von mutiertem humanem *KCNJ5*, um den Einfluss der Mutationen auf den Organismus näher untersuchen zu können. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde Exomsequenzierung eingesetzt, womit wir weitere somatische Mutationen in APA<sup>12</sup> und bei Insulinompatienten<sup>42</sup> identifizieren konnten.

Unsere Arbeiten haben die aktuelle Entwicklung der Nebennierenforschung über die letzten Jahre begleitet und ihren Teil dazu beigetragen, dass Mechanismen der autonomen Aldosteronproduktion heute besser verstanden werden.

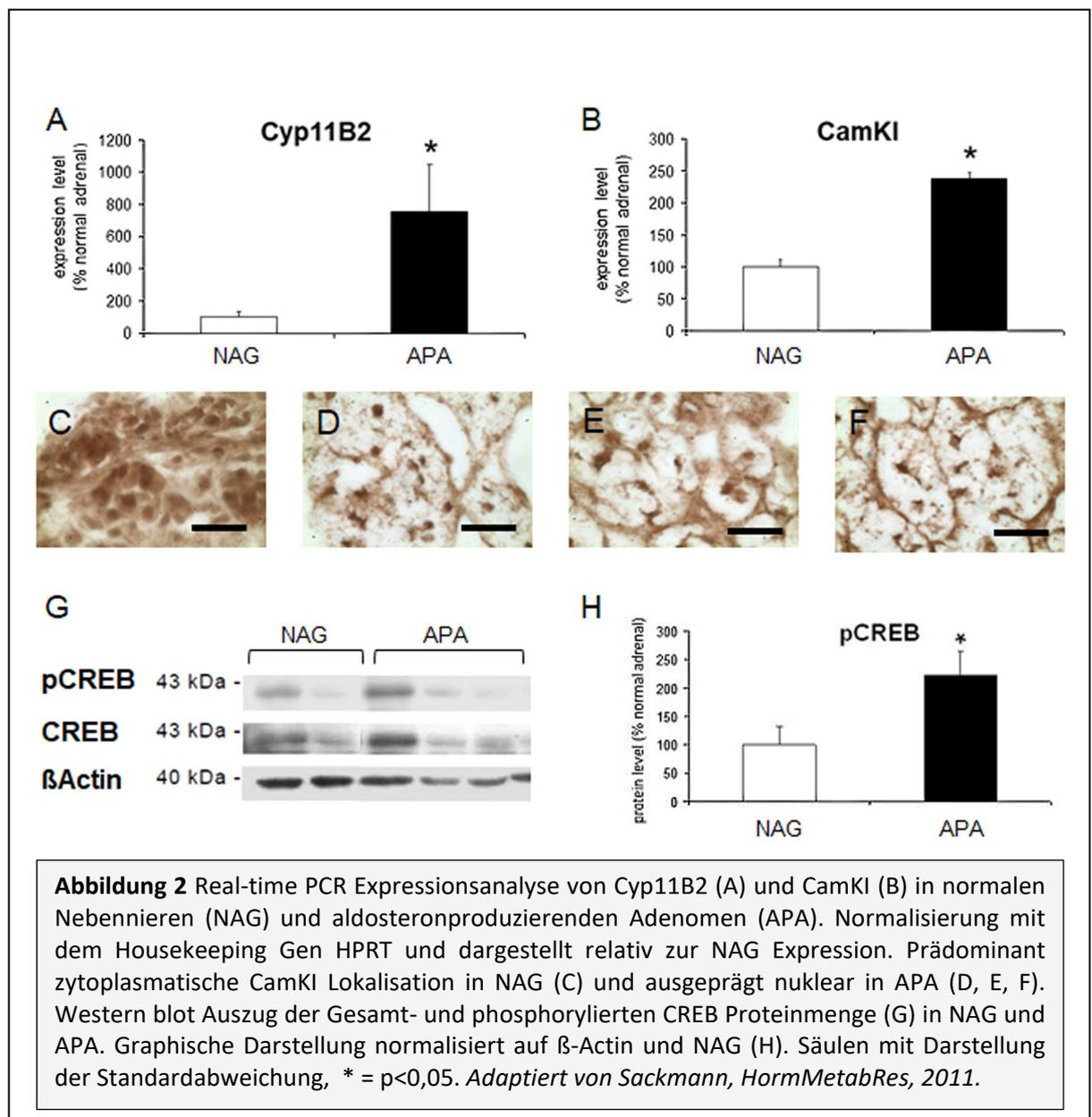
### **3 Eigene Forschung zum Thema**

#### *3.1 Physiologische Mechanismen bei der autonomen Aldosteronproduktion*

Publikation: Sackmann S, **Lichtenauer U**, Shapiro I, Reincke M, Beuschlein F. 2011. Aldosterone producing adrenal adenomas are characterized by activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) dependent pathways. *Horm Metab Res* 43(2):106-11.

CaM Kinasen spielen bei der physiologischen Regulation der Aldosteronsynthese und -freisetzung eine Schlüsselrolle. Zur Überprüfung der Relevanz in der Pathogenese von humanen APA untersuchten wir die Expression von CaM Kinasen auf mRNA- und Proteinebene. In Real-time PCR Analysen fand sich eine zwischen den einzelnen Tumoren sehr heterogene, insgesamt aber erwartungsgemäß deutliche Überexpression der Aldosteronsynthese (*CYP11B2*) im Vergleich zu normalem Nebennierengewebe (NAG; n=11, 752,7±298 vs. n=8, 100±31 %; p=0,034, Abbildung 2A). Upstream fand sich als mögliche Ursache für die transkriptionelle Aktivierung CaMK I auf mRNA und Proteinebene im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls signifikant überexprimiert (mRNA: n=11, 238±9 vs. N=8, 100±11 %; p<0,01, Protein: n=19, 274±60 vs. N=13, 100±26%; p<0,01, Abbildung 2B). CaMK I wird üblicherweise im Zytosol exprimiert und calciumabhängig stimuliert<sup>23,33,58</sup>. Wir fanden überraschend in den untersuchten APA immunohistochemisch dagegen vornehmlich

eine nukleäre Expression von CaMK I, was zu einem stimulatorischen Einfluss auf die Transkription von *CYP11B2* führen könnte (Abbildung 2C–F). Eine Mutation in der nuclear export sequence (*NES*) schlossen wir aus. Darüber hinaus fand sich für CREB, ein Zielprotein von CaMKI, eine erhöhte Phosphorylierung bei APA im Vergleich zu normalen Nebennieren und somit ein erhöhter Aktivierungsgrad (n=21, 223±43 vs. n=13, 100±31 %, p=0,05, Abbildung 2G–H).



Zusammenfassend ließ sich in APA im Vergleich zu normalen Nebennieren eine Überexpression der Aldosteronsynthese im Sinne einer transkriptionell bedingten erhöhten

Aldosteronproduktion zeigen. Dabei ließ sich auch eine Beteiligung wichtiger physiologischer Regulatoren der Aldosteronsynthese sowohl auf Genexpressions-, als auch auf Proteinebene nachweisen<sup>62</sup>.

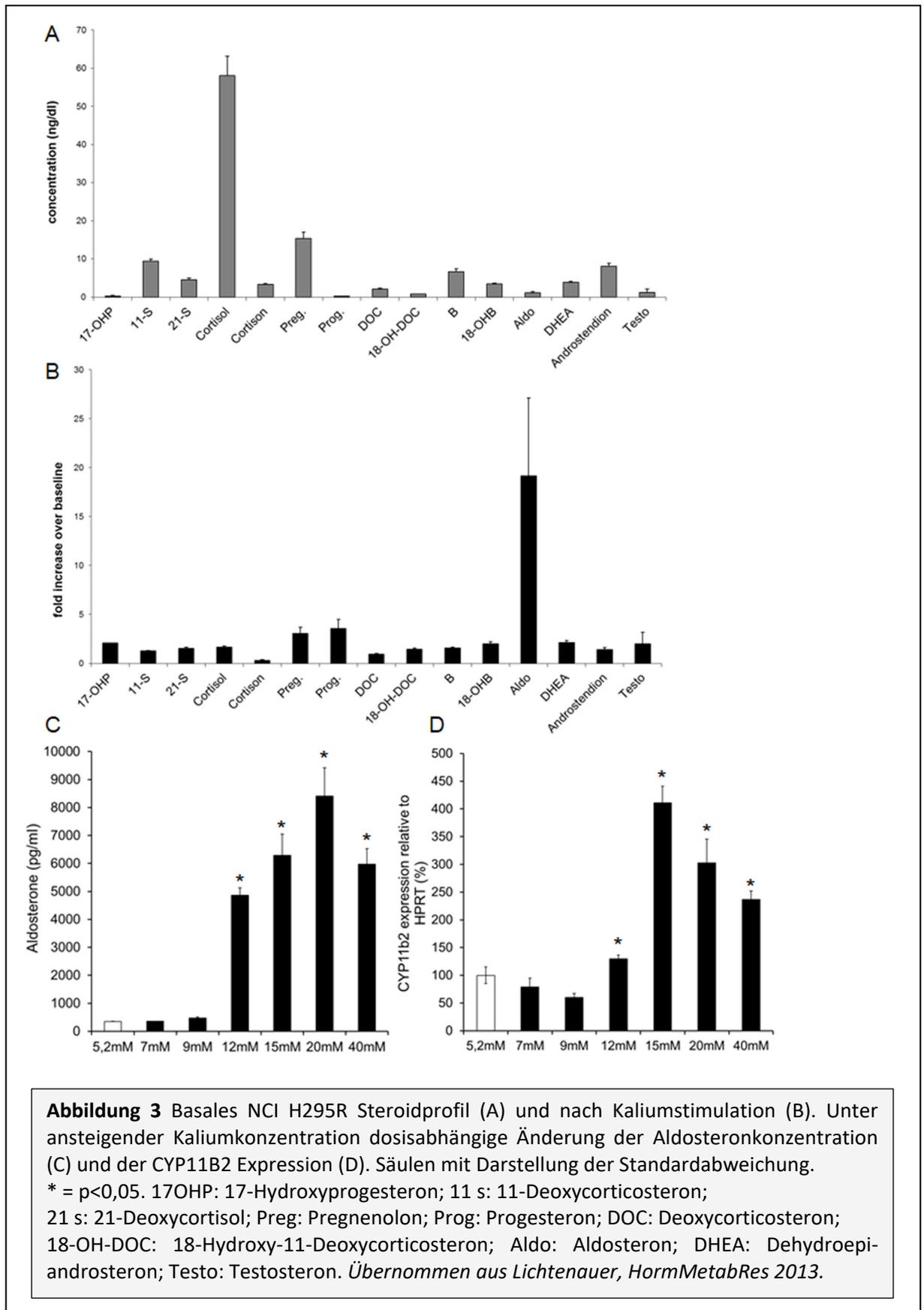
### 3.2 NCI H295R Zelllinie als Modell für den primären Hyperaldosteronismus

Publikation: **Lichtenauer UD**, Shapiro I, Osswald A, Meurer S, Kulle A, Reincke M, Riepe F, Beuschlein F. 2013 Characterization of NCI-H295R cells as an in vitro model of hyperaldosteronism. *Horm Metab Res* 45:124-129.

Um weitere beteiligte, bisher unbekannte Gene zu identifizieren, kommen genomweite Screeningverfahren zum Einsatz. Wir setzten ein Mausmodell und Microarray ein. Die Auswahl der Stimulations- bzw. Testbedingungen für die *in vitro* Überprüfung der Microarray Ergebnisse sind entscheidend für die Ergebnisqualität. Versuchsspezifische Unterschiede allein können bereits zu sich widersprechenden Ergebnissen führen (z.B. steigende<sup>48</sup>, sinkende<sup>64</sup> oder gleichbleibende<sup>18</sup> Glukokortikoidkonzentrationen unter Kaliumstimulation). Für die humane Nebennierenkarzinomzelllinie NCI H295R sind unterschiedliche Subpopulationen mit teils unterschiedlichen Charakteristiken beschrieben worden<sup>76</sup>. Gleichwohl zeichnet sie sich im Gegensatz zu der adrenokortikalen SW13 Zelllinie durch eine Aldosteronproduktion aus. Im Folgenden wurde die Eignung der NCI H295R Zellen für die Validierung der mittels Microarray erfassten Kandidatengene überprüft.

Im Steroidprofil zeigt sich erwartungsgemäß, dass vor allem Cortisol von NCI H295R Zellen sezerniert wird (58,0±5,1 ng/dl; Abbildung 3A). Die Aldosteronkonzentration lag, ähnlich zur Situation *in vivo*, mit 328 – 716 pg/ml deutlich darunter, ließ sich durch ACTH und Angiotensin II, vor allem aber durch Kalium dosisabhängig und selektiv - bei 20 mM Kalium auf 8407±1013 pg/ml - um das 19,2-fache steigern (Abbildung 3B+C). Um einen reinen Sekretionseffekt auszuschließen, erfassten wir auch die Expression von *CYP11B2*, die

ebenfalls kaliumabhängig signifikant anstieg ( $411 \pm 0,3$  %; Abbildung 3D).



Die Ergebnisse machen deutlich, dass sich die NCI H295R Zelllinie durch eine robuste Steroidhormonproduktion auszeichnet, mit einer gut definierbaren, dosisabhängigen und selektiven Steigerung der Mineralkortikoidproduktion. Kalium stellt sich dabei als Hauptstimulator für die Aldosteronausschüttung heraus. Letzteres deckt sich mit Beobachtungen anderer Gruppen und wird vornehmlich darauf zurückzuführen sein, dass NCI H295R Zellen weder den ACTH-Rezeptor (MC2-r), noch den Ca<sub>v</sub>3.2 T-Typ Calciumkanal relevant exprimieren<sup>35,57</sup>. Abschließend können die Zellen für die weiterführende Untersuchung der im Microarray ermittelten kaliumabhängig regulierten Gene als geeignet bewertet werden<sup>44</sup>.

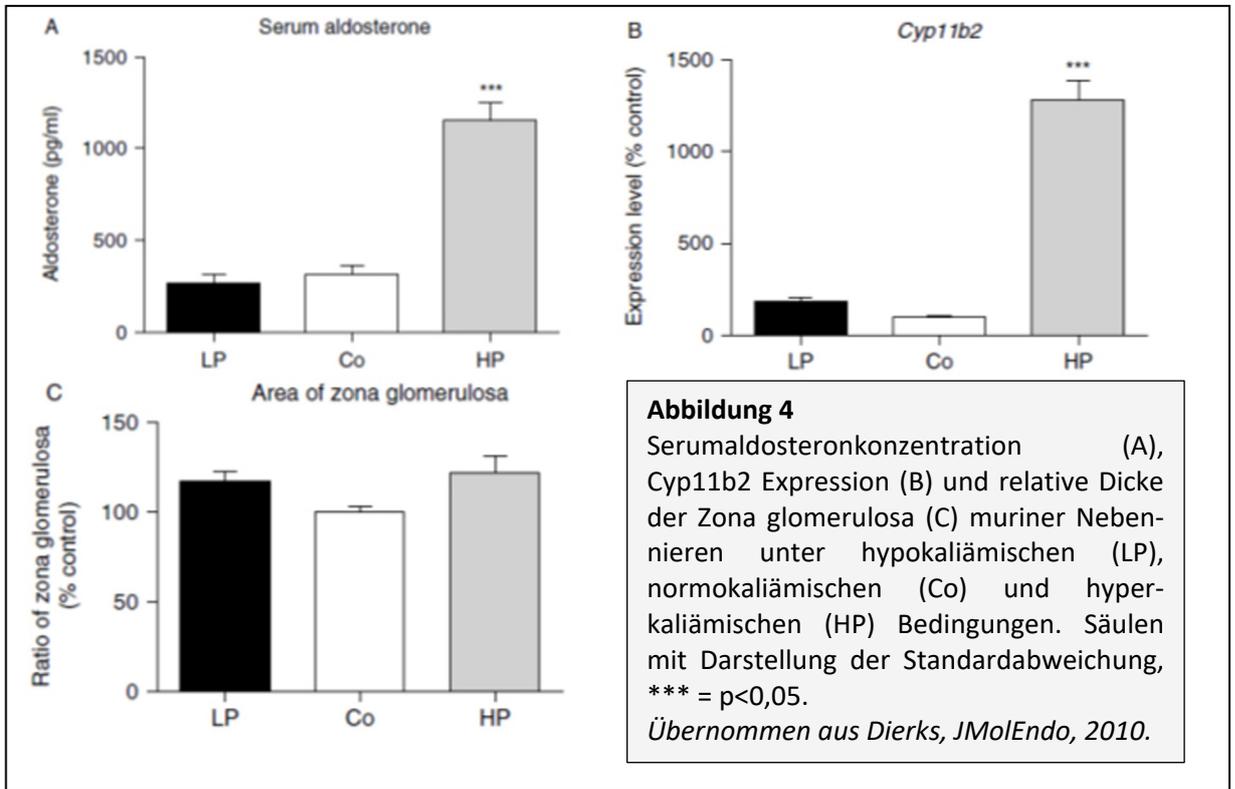
### *3.3 Kaliumabhängige Änderungen des Transkriptoms im Tiermodell*

Publikation: Dierks A\*, **Lichtenauer UD\***, Sackmann S, Spyroglou A, Shapiro I, Geyer M, Manonopoulou J, Reincke M, Hantel C, Beuschlein F 2010. Identification of adrenal genes regulated in a potassium-dependent manner. *J Mol Endocrinol* 45:193-206.

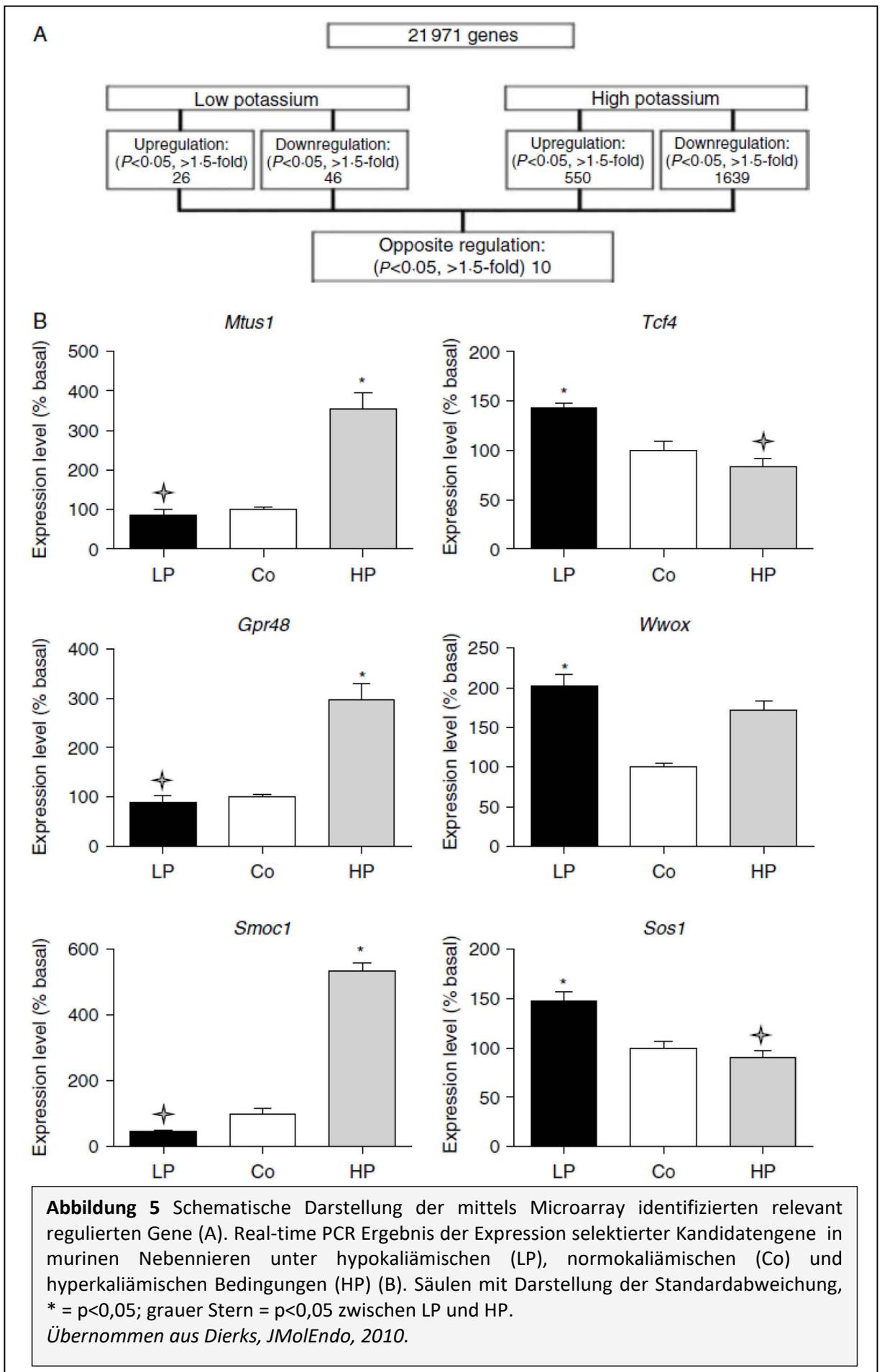
In dem vorherigen Experiment bestätigte sich, dass die Aldosteronsekretion neben Angiotensin II maßgeblich durch extrazelluläre Kaliumkonzentrationsänderungen beeinflusst wird. Um kaliumabhängige transkriptionelle Veränderungen *in vivo* zu untersuchen, wurden mittels Microarray das Nebennieren-Transkriptom von 90 CD1 Wildtyp Mäusen untersucht, die zuvor durch Nahrung und Trinkwasser unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen ausgesetzt worden waren. Hierfür wurden je 30 8-Wochen alte Wildtypiere 28 Tage lang einer kaliumreichen (11380 mg Kalium/kg sowie Wasser mit 2% KCl), einer kaliumarmen (7171 mg Kalium/kg sowie destilliertes Wasser) und, als Kontrollgruppe, einer Standardernährung (9100 mg Kalium/kg sowie destilliertes Wasser) ausgesetzt.

Trotz einer morphologisch nur geringen Zunahme der Zona glomerulosa-Breite (122,2±9,5 vs. 100±3,8 %; p=0,04) fand sich in der hyperkaliäm ernährten Gruppe (HP) ein 3,5-facher

Aldosteronanstieg ( $1151 \pm 98$  vs.  $315 \pm 46$  pg/ml;  $p < 0,01$ ) und ein 12,5-facher Anstieg der adrenalen *Cyp11b2* Expression ( $1279,2 \pm 102,3$  vs.  $100 \pm 5,4$  %;  $p < 0,01$ ) im Vergleich zur regulär ernährten Gruppe (Co; Abbildung 4).



Insbesondere in der hyperkaliäm ernährten Gruppe zeigten sich dann auch mit 2189 regulierten Genen relevante Expressionsunterschiede  $> 1,5$  im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). In der hypokaliäm (LP) ernährten Gruppe waren es 72 signifikant regulierte Gene (Abbildung 5A). Die meisten der identifizierten Gene sind bisher noch nicht im Zusammenhang mit der Nebennierenphysiologie oder der autonomen Aldosteronproduktion beschrieben worden<sup>8,40</sup>.



Wir konzentrierten uns daher zunächst vor allem auf die gegensätzlich regulierten Gene. *Mtus1* (HP 354,5±41,3 vs. Co 100±7,3, LP 85,3±16,7 %; p<0,01), *Smoc1* (HP 531,9±25,9 vs. Co 100±15,4, LP 44,9±6,1 %; p<0,01) und *Gpr48* (HP 297±31.9 vs. Co 100±6, LP 87,9±14,4 %; p<0.01) waren in der HP Gruppe relevant überexprimiert im Vergleich zur Kontroll- und Co-Gruppe. Andersherum fand sich für *Tcf4* (LP 143±4,8 vs. Co 100±9, HP 84±8%; p=0.006), *Sos1* (LP 148,1±8.5 vs. Co 100±6.9, HP 90,5±7,1%; P=0.005) und *Wwox* (LP 202,8±13.3 vs. Co 100±4.9%; P<0.001) im Vergleich zu den anderen Gruppen eine relevante Überexpression in der LP Gruppe (Abbildung 5B).

Unter *in vitro* Bedingungen zeigte sich unter Kaliumstimulation der NCI H295R Zellen bei den Kandidatengenen ein uneinheitliches Bild: Obwohl die Überexpression vieler in der Microarray Untersuchung signifikant regulierter Gene auch unter diesen Bedingungen zu beobachten war, ließ sich dieser Effekt überraschenderweise für die zuvor aufgeführten differentiell regulierten Gene nur für *MTUS1* zeigen (10,8 mM K<sup>+</sup>, 105±7,5 %, p=n.s.; 25,8 mmol K<sup>+</sup>, 130±9 %, vs. 5,8 mM K<sup>+</sup>, 100±6,8 %, p<0,05), während sich die Expression der anderen Kandidatengene nicht signifikant, oder, für *WWOX*, sogar entgegengesetzt änderte (10,8 mM K<sup>+</sup>, 149±15,3 %, p=0,01; 25,8 mmol K<sup>+</sup>, 262±21,5 %, vs. 5,8 mM K<sup>+</sup>, 100±2 %, p<0,01). Interessanterweise ist *WWOX* als Tumor Suppressorgen in verschiedenen humanen Tumorentitäten beschrieben worden und ist in die Regulation der Steroidogenese involviert. Zudem wurde eine Herabregulation von *Cyp11a1* bei *Wwox* Knock-out Mäusen beobachtet<sup>2,3</sup>. Somit könnte *WWOX* bei der Regulation der kaliumabhängigen Aldosteronsekretion durchaus eine interessante Rolle spielen. Die Überexpression des für die Zellzykluskontrolle bekannten *Gpr48* könnte als Reaktion auf das Kaliumüberangebot interpretiert werden<sup>30</sup>.

Das Expressionsmuster der Kandidatengene wurde darüber hinaus in 12 humanen Aldosteron produzierenden Adenomen im Vergleich zu 8 normalen Nebennieren untersucht. Hier fand sich bei den differentiell regulierten Kandidatengen ein signifikanter Expressionsunterschied für *MTUS1*, das herunterreguliert war ( $54,7 \pm 7,1$  vs.  $100 \pm 17,4$  %,  $p=0,01$ ). In Zusammenschau mit der Hochregulation unter Kaliumstimulation *in vivo* und *in vitro*, ist die Herabregulation in APA als physiologische Reaktion auf die Hypokaliämie zu werten. Für *SPP1* ließ sich wiederum eine Suppression feststellen ( $24,4 \pm 11,7$  vs.  $100 \pm 26,2$  %,  $p=0,01$ ). Es kodiert für das Protein Osteopontin, das vor allem in Knochen zu finden ist und sich insbesondere durch seine Calcium-Bindungseigenschaften auszeichnet. Eine Überexpression führt zur ektopen Calcifizierung<sup>1,70</sup>. Interessanterweise konnte *SPP1* in einer Metaanalyse als eins von 36 Genen identifiziert werden, das durch Suppression eine pathophysiologische Rolle in der prähypertensiven Phase spielen könnte<sup>47</sup>. Die Suppression von *SPP1* in humanen APA könnte somit relevant sein. Die übrigen ermittelten Gene scheinen beim humanen primären Hyperaldosteronismus keine wesentliche pathophysiologische Rolle zu spielen<sup>26</sup>.

### 3.4 Adrenale Transkriptionsfaktoren

Publikation: **Lichtenauer UD**, Duchniewicz M, Kolanczyk M, Hoeflich A, Hahner S, Else T, Bicknell AB, Zemojtel T, Stallings NR, Schulte DM, Kamps MP, Hammer GD, Scheele JS, Beuschlein F 2007. Pre-B-cell transcription factor 1 and steroidogenic factor 1 synergistically regulate adrenocortical growth and steroidogenesis. *Endocrinology* 148:693-704.

Dass Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften in der Tumorgenese teilweise einen entscheidenden Stellenwert haben können, hat in der letzten Zeit viel Aufmerksamkeit erregt, stellt dieses Modell doch einen alternativen Erklärungsansatz zur etablierten 2-hit-Hypothese dar, insbesondere was die Tumorerogenität und die zu therapierenden Zielzellen angeht. In diesem Zusammenhang ist in APA eine *CTNNB1* Mutation gefunden

worden, die zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin führen soll, womit eine LHCGR-vermittelte Dedifferenzierung von adrenokortikalen Zellen mit nachfolgender Aktivierung gonadaler Gene postuliert wird<sup>73</sup>. In einer weiteren Publikation wurde gezeigt, dass in 70 % aller APA eine Aktivierung des Wnt-Pathways gefunden wird, der in der Embryonalentwicklung und der Kanzerogenese einen wichtigen Stellenwert hat<sup>11</sup>. In dem zuvor beschriebenen Microarray-Experiment konnten wir unter Kaliumstimulation passend hierzu eine signifikante Hochregulation der Expression von *Wnt4*, notwendig für die Entwicklung der Zona glomerulosa der Nebenniere sowie für die Steroidbiosynthese nachweisen (nicht abgebildet)<sup>21,32</sup>. Gain of function Mutationen alleine können diese Beobachtungen nicht erklären, so die Untersuchung von involvierten Transkriptionsfaktoren sinnvoll erscheint.

Einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren in der Nebennierenentwicklung ist SF1. Für *SF1* und andere potentielle Nebennierenstammzellmarker ist eine Überexpression in APA im Vergleich zu normalen Nebennieren nachgewiesen worden<sup>17,20</sup>. Interessanterweise deuten *Pbx1* Überexpressionsexperimente auf einen inhibitorischen Effekt auf die Aldosteronsynthese hin<sup>56</sup>. *Pbx1* ist ebenfalls ein wichtiger adrenaler Transkriptionsfaktor und war bisher für die Initiierung der *Sf1* Expression in der fetalen Nebenniere bekannt<sup>79</sup>. *Pbx1* könnte aber in aldosteronproduzierenden Mikroadenomen eine Rolle spielen, konnte dort doch eine transkriptionelle Aktivierung von *CYP17* nachgewiesen werden<sup>6</sup>. Somit könnte PBX1 als ein wichtiger Regulator der CYP17 Aktivität an einer Cortisol-Kosekretion beteiligt sein und diese molekular erklären<sup>38,43,51,54</sup>.

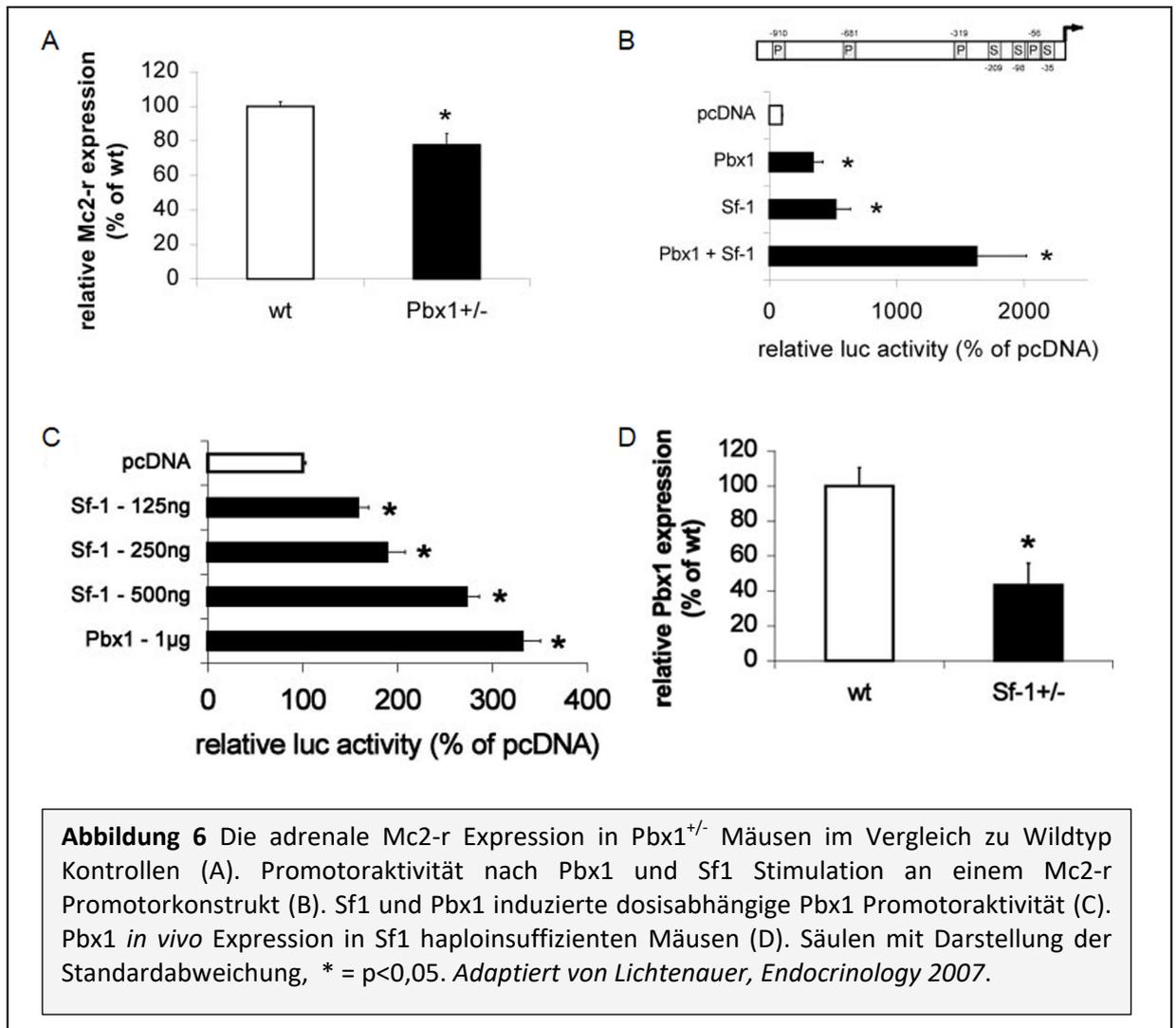
*Pbx1* gehört zu der Gruppe der non-hox-homeodomain Transkriptionsfaktoren. Diese spielen in der Embryonalentwicklung und der Organogenese eine wichtige Rolle, indem sie bewirken, dass sich homeodomain Proteine mit höherer Affinität und Spezifität an die Ziel-

DNA binden können. Bei  $Pbx1^{-/-}$  Mäusen führt das Fehlen der  $Pbx1$  abhängigen Expression von 17 $\alpha$ -Hydroxylase<sup>37</sup>, die für die Biosynthese von Cortison und Androgene essentiell ist, zu adrener Hypoplasie, gestörter Hämatopoese und Pankreasentwicklung, Nierenagenese und gestörter skeletaler und urogenitaler Entwicklung<sup>66</sup>. Da der  $Pbx1$  knock-out an Embryonaltag 15 – 16 letal ist, führten wir unsere Untersuchungen an  $Pbx1$  haploinsuffizienten Tieren durch. Morphologisch waren die Nebennieren dieser Tiere kleiner, mit einem relevant niedrigerem Gesamtgewicht im Vergleich zu Wildtyp Tieren ( $4,4\pm 0,4$  vs.  $7,5\pm 0,3$  mg,  $p<0,01$ ). Der Proliferationsmarker  $Pcna$  war in  $Pbx^{+/-}$  Tieren deutlich vermindert auf mRNA- (real time PCR  $52\pm 13$  vs.  $100\pm 8\%$ ,  $p=0,01$ ) und Proteinebene. Demgegenüber fand sich eine Hypertrophie der Zona fasciculata ( $63,0\pm 3,3$  vs.  $89,3\pm 8,3\%$ ,  $p=0,01$ ). Unilaterale Adrenalektomie führte bei den  $Pbx1$  haploinsuffizienten Tieren zu einem deutlich reduzierten kompensatorischen Wachstum der verbleibenden Nebenniere ( $+1,7\pm 0,1$  mg,  $p=0,65$  vs.  $+2,7\pm 0,1$  mg,  $p<0,01$ ). Beides könnte auf eine Beeinträchtigung oder Suppression der subkapsulären adrenalen Stammzellzone hindeuten - ebenso wie bei  $Sf1$  heterozygoten Tieren zuvor beschrieben<sup>14</sup>. Tatsächlich konnten wir bei  $Pbx^{+/-}$  Tieren eine relevant geringe Anzahl an side population Zellen, die meist einen hohen Stammzellanteil besitzen, nachweisen<sup>41</sup>. Man kann spekulieren, dass die im Rahmen eines Hyperaldosteronismus gefundene Überexpression von  $SF1$  zur Differenzierung von adrenalen Vorläuferzellen in Zona glomerula Zellen beitragen kann. Obwohl die Plasma Cortikosteronkonzentrationen zwischen  $Pbx^{+/-}$  und wt Tieren ähnlich war ( $18,8\pm 6,2$  vs.  $16,7\pm 4,7$  ng/ml), fand sich eine deutlich reduzierte Stimulierbarkeit im ACTH-Test ( $184,4\pm 57,6$  vs.  $358,8\pm 28,3$  ng/ml) im Sinne einer kompensierten Nebenniereninsuffizienz. Auch dieser Phänotyp ähnelt dem der  $SF1$  heterozygoten Kock-out Tiere<sup>14,15</sup> und lässt sich im  $Pbx^{+/-}$  Kontext möglicherweise auf die deutlich erniedrigte Expression des ACTH Rezeptors

(Mc2-r;  $77,7 \pm 7,9$  vs.  $100 \pm 2,8\%$ ,  $p=0,02$ ) zurückführen (Abbildung 6A). *In vitro* ließ sich an einem Mc2-r Konstrukt durch die 4 Bindungsstellen für Pbx1-Heterodimere eine Pbx1 abhängige Promotoraktivierung nachweisen, die der der Sf1 Aktivierung durch die bekannten 3 Sf1 Bindungsstellen ähnelt (Pbx  $342,0 \pm 81,2$  vs. pcDNA  $100 \pm 4,7\%$ ,  $p<0,01$ ; Sf1  $520,8 \pm 121,3$  vs.  $100 \pm 4,7\%$ ,  $p<0,01$ ). Somit ist der Mc2-r ein direktes Ziel von Pbx1, unabhängig von der Sf1 Aktivität. Die Stimulation mit Pbx1 und Sf1 zusammen führte zu einer noch stärkeren Mc2-r-Aktivierung ( $1627,4 \pm 408,2\%$ ,  $p<0,01$ ), so dass wir synergistische Effekte von Sf1 und Pbx1 am Mc2-r Promotor postulierten (Abbildung 6B). Eine direkte Bindung beider Transkriptionsfaktoren aneinander konnten wir nicht beobachten.

Am Pbx1 Promotor finden sich 4 potentielle Sf1 Bindungsstellen. Sf1 Stimulation führt zu einer dosisabhängigen Steigerung der Pbx1 Promotoraktivität (125 ng Sf-1,  $157,7 \pm 6,9$ ,  $p=0,02$ ; 250 ng Sf-1,  $188,4 \pm 8,9$ ,  $p=0,01$ ; 500 ng Sf-1,  $272,2 \pm 17,0\%$ ,  $p<0,01$  vs. pcDNA,  $100 \pm 4,7\%$ ), was erklären könnte, warum sich bei *Sf1*<sup>+/-</sup> Mäusen relevant geringere Pbx1 mRNA ( $43,3 \pm 15,3$  vs.  $100 \pm 12,7\%$ ,  $p=0,05$ ) nachweisen lässt (Abbildung 6D). Die Pbx1 Promotoraktivität lässt sich ebenso durch Stimulation mit Pbx1 selbst ( $331,1 \pm 24,0$  vs.  $100 \pm 4,7\%$ ,  $p<0,01$ ) im Sinne eines positiven Feed-back loops signifikant steigern, was eine stabilere Pbx1 Expression in den Zielzellen bewirken dürfte (Abbildung 6C).

Zusammengefasst kommen Sf1 und Pbx1 eine entscheidende Bedeutung nicht nur in der Organogenese, sondern auch zum Organerhalt und zur Regulation in der adulten Nebenniere zu. Die Rolle der Transkriptionsfaktoren beim Hyperaldosteronismus ist bisher aber nicht sicher geklärt.



### 3.5 Mutierte Ionenkanäle und Störung der elektrophysiologischen Homöostase

Publikationen: **Lichtenauer UD\***, Di Dalmazi G\*, Slater EP, Wieland T, Kuebart A, Schmittfull A, Schwarzmayr T, Diener S, Wiese D, Thasler WE, Reincke M, Meitinger T, Schott M, Fassnacht M, Bartsch DK, Strom TM, Beuschlein F. 2015. Frequency and clinical correlates of somatic Ying Yang 1 mutations in sporadic insulinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 100(5):E776-82.

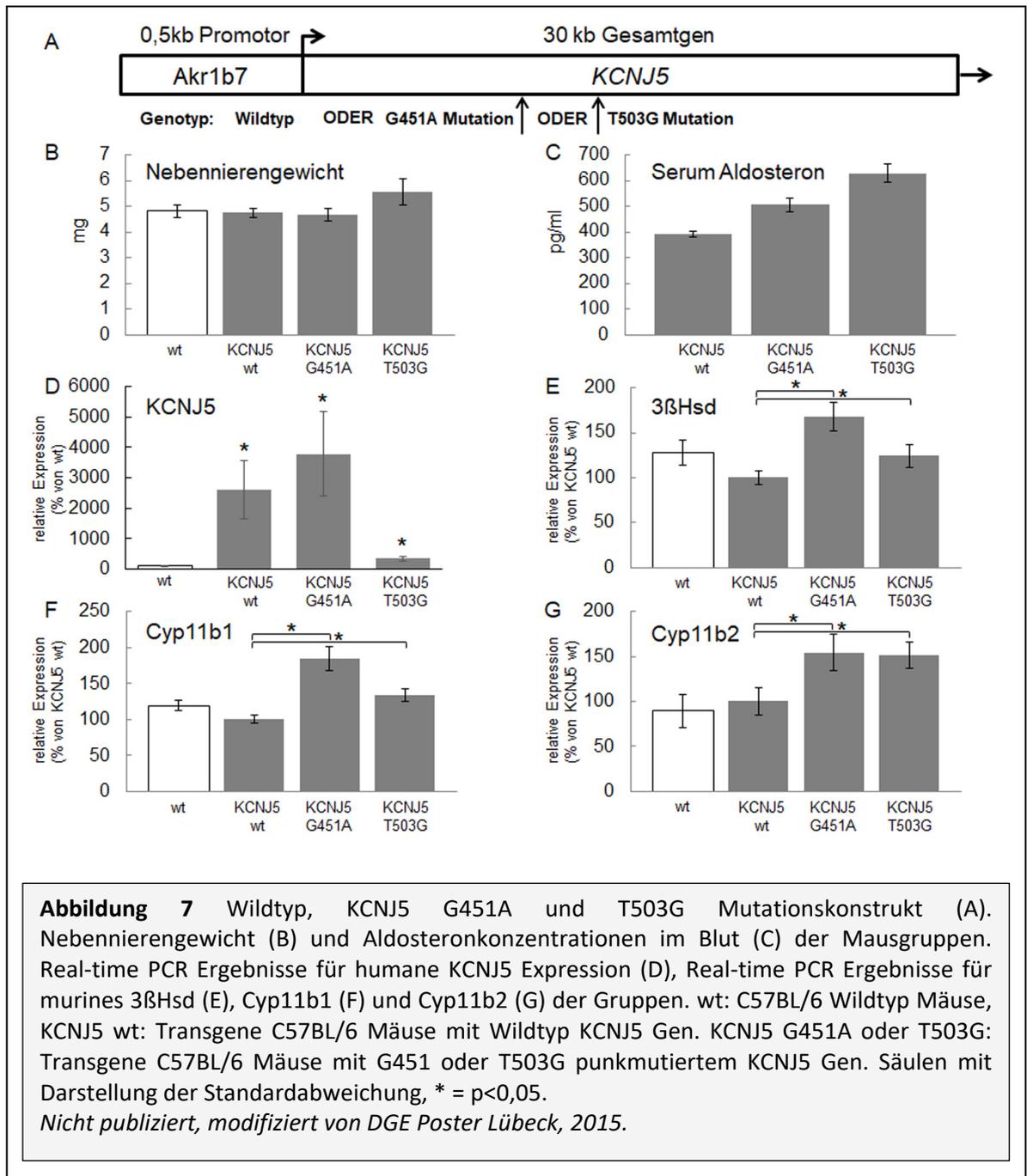
Beuschlein F, Boulkroun S, Osswald A, Wieland T, Nielsen HN, **Lichtenauer UD**, Penton D, Schack VR, Amar L, Fischer E, Walther A, Tauber P, Schwarzmayr T, Diener S, Graf E, Allolio B, Samson-Couterie B, Benecke A, Quinkler M, Fallo F, Plouin PF, Mantero F, Meitinger T, Mulatero P, Jeunemaitre X, Warth R, Vilsen B, Zennaro MC, Strom TM, Reincke M 2013 Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. *Nat Genet* 45:440-444, 444e441-442.

2011 konnten in 30 – 40 % aller APA sporadische DNA Mutationen im *KCNJ5*-Gen, das für einen wichtigen Kaliumkanal kodiert,<sup>16,22</sup> gefunden werden. Der resultierende

Natriumeinstrom führt zur dauerhaften Depolarisation der Zona glomerulosa Zelle mit nachfolgender dauerhafter Aktivierung der Aldosteronproduktion.

Um die molekularen Folgen des *KCNJ5*-abhängigen Hyperaldosteronismus näher zu untersuchen, entwickelten wir ein Mausmodell mit dem Ziel, mittels DNA-Mikroinjektion unter einem relativ nebennierenspezifischen Promotor zwei als besonders klinisch relevant beschriebene *KCNJ5*-Mutationen, G451A und T503G, organspezifisch zu überexprimieren.

Hierfür wurden 3 verschiedene Plasmide vorbereitet, die hinter einem 0,5 kb Fragment des *Akr1b7* Promotors entweder ein komplettes humanes *KCNJ5* Wildtypgen oder ein punktmutiertes Gen besitzen und in C57BL/6 Mäuse übertragen. Die detaillierten Ergebnisse werden im Rahmen einer Doktorarbeit zurzeit zusammengetragen. Im Wesentlichen zeigen sich, wie schon beim Kaliumstimulationsversuch der CD30 Mäuse, bei 8 Wochen alten Tieren morphologisch keine Unterschiede zwischen den Nebennieren der verschiedenen Gruppen (Abbildung 7A). *KCNJ5* war erwartungsgemäß bei den transgenen Tieren deutlich überexprimiert (Abbildung 7D). Die Expression der Gene wichtiger Enzyme der Steroidbiosynthese waren bei mutierten *KCNJ5* Tieren ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zu *KCNJ5* Wildtyp Tieren. Als Beispiel für weibliche *KCNJ5* T503G Tiere:  $3\beta\text{Hsd}$  ( $124,1 \pm 9,9$  vs.  $100,0 \pm 1,8\%$ ,  $p=0,03$ ),  $\text{Cyp}11\beta 1$  ( $133,5 \pm 9,1$  vs.  $100,0 \pm 5,4\%$ ,  $p < 0,01$ ) und  $\text{Cyp}11\beta 2$  ( $151,8 \pm 14,6$  vs.  $100,0 \pm 15,3\%$ ,  $p=0,03$ , Abbildung 6E-G). Trotzdem fanden sich nur tendenziell erhöhte Aldosteronspiegel in den *KCNJ5*-mutierten Tieren im Vergleich zu Wildtyp-transgenen Tieren (Abbildung 7C).

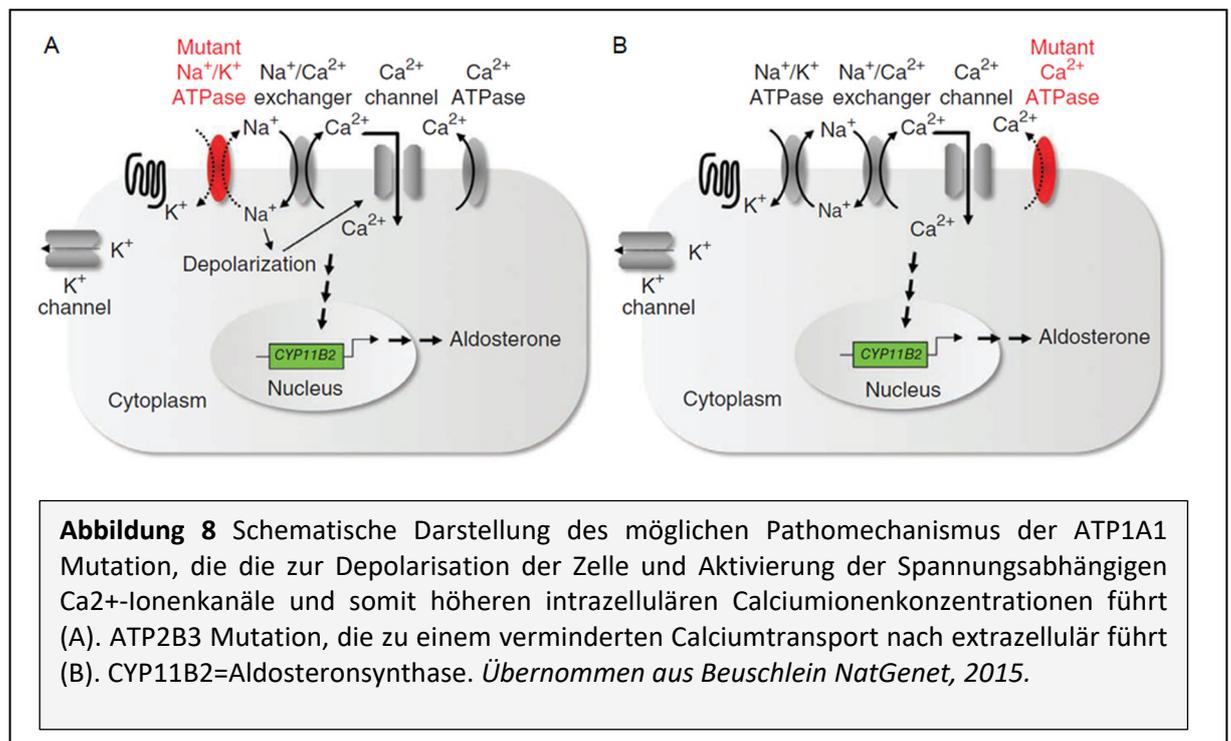


Obwohl die finale Bewertung der Ergebnisse noch aussteht, bleiben die phänotypischen Veränderungen trotz der gewünschten Überexpression von mutiertem KCNJ5 hinter den Erwartungen zurück, so dass das aktuelle Modell nicht für gezielte molekulare pharmakologische Interventionsstudien in Frage kommen wird.

Die *KCNJ5* Mutationen wurden mittels Exomsequenzierung identifiziert, ein relativ neues Verfahren zum Massenscreening von Genveränderungen. Allein auf dem endokrinen Fachgebiet wurden mit Hilfe dieser neuen Methode wichtige Genalterationen wie z.B. PKA Mutationen bei 34 % der Patienten mit floridem Cushing Syndrom<sup>13</sup> und USP8 Mutationen in 40 % der Fälle mit corticotrophen Hypophysenadenomen<sup>60</sup> gefunden. In einer eigenen Untersuchung konnten wir mittels Exomsequenzierung bei 8 Insulinomen 41 somatische Alterationen mit einer durchschnittlichen Mutationsrate von  $5,1 \pm 2,1$  (1 – 12) Mutationen pro Probe identifizieren. Eine identische Thr372Arg Mutation im YingYang1 Gen (YY1) lag in 2 Fällen vor, die sich im Sinne einer somatischen Mutation nicht in der korrespondierenden Leukozyten DNA nachweisen ließ. Die anschließende Sequenzierung des Gens bei insgesamt 47 Insulinompatienten zeigte eine YY1-Mutation in 6 Fällen (13 %)<sup>42</sup>.

In einem anderen Experiment suchten wir mittels Exomsequenzierung nach weiteren genetischen Ursachen für den primären Hyperaldosteronismus. 9 Aldosteron produzierende Adenome und Kontrollgewebe wurden gescreened, wobei  $4,1 \pm 1,4$  (0 – 13) proteinverändernde Mutationen pro Adenom identifiziert werden konnten. Diesmal fanden sich multiple somatische Varianten in 2 Mitgliedern der p-Typ ATPase Genfamilie: *ATP1A1*, das für eine  $\alpha$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase kodiert und primär in der Zona glomerulosa exprimiert wird, und *ATP2B3*, das für die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase kodiert und in allen 3 Zonen der Nebenniere exprimiert wird. Diese Pumpen sind essentiell für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials. Im Verlauf untersuchten wir insgesamt 308 Adenome auf *ATP1A1*- und *ATP2B3*- Alterationen mittels Sequenzierung und fanden insgesamt 21 Fälle mit Mutationen (6,8%).

Klinisch waren die betroffenen Patienten vor allem männlich (17/21 Mutationen; 81%), hatten höhere präoperative Aldosteronkonzentrationen (Median 397,8 vs. 286,6 ng/l,  $p=0,02$ ) und signifikant niedrigere Kaliumkonzentrationen (2,6 vs. 3,1 mM,  $p=0,01$ ) im Vergleich zu Patienten ohne diese Mutationen, bzw. mit *KCNJ5* Mutationen.



Wir gehen davon aus, dass die Mutationen zu einer Inaktivierung der ATPasen führen und damit durch *ATP1A1* indirekt oder durch *ATP2B3* direkt zu einer intrazellulären Calciumkonzentrationserhöhung, was eine Depolarisation der Zelle auslöst. In der Folge kommt es zur Aktivierung der intrazellulären calciumabhängigen Signalkaskade mit resultierender erhöhter Aldosteronausschüttung (Abbildung 8).

## 4 Schlussfolgerung und Ausblick

Aus den vorgenannten Arbeiten wird deutlich, dass sich das Detailwissen über die Ursachen der autonomen Aldosteronproduktion inzwischen erheblich erweitert hat. Es zeigt sich aber auch, wie komplex das Zusammenspiel auf molekularer Ebene ist, haben sich doch verschiedene zelluläre, transkriptionelle, posttranskriptionelle und mutationsbedingte elektrophysiologische Änderungen in unterschiedlicher Ausprägung als relevant pathologisch gezeigt. Die Einordnung der verschiedenen Einzelergebnisse in einen Gesamtkontext fällt nicht immer leicht, hat doch jedes der Experimente Limitationen. Dazu gehören speziesspezifische Unterschiede, aber auch die Tatsache, dass *in vitro* Modelle das komplexe Organsystem Nebenniere nicht vollständig abbilden können. *In vivo* Modelle wiederum sind nicht frei von Einflüssen des Aldosteron-Renin Systems, der Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenachse, des zellulären und parakrinen Netzwerks und weiteren Regulationsmechanismen.

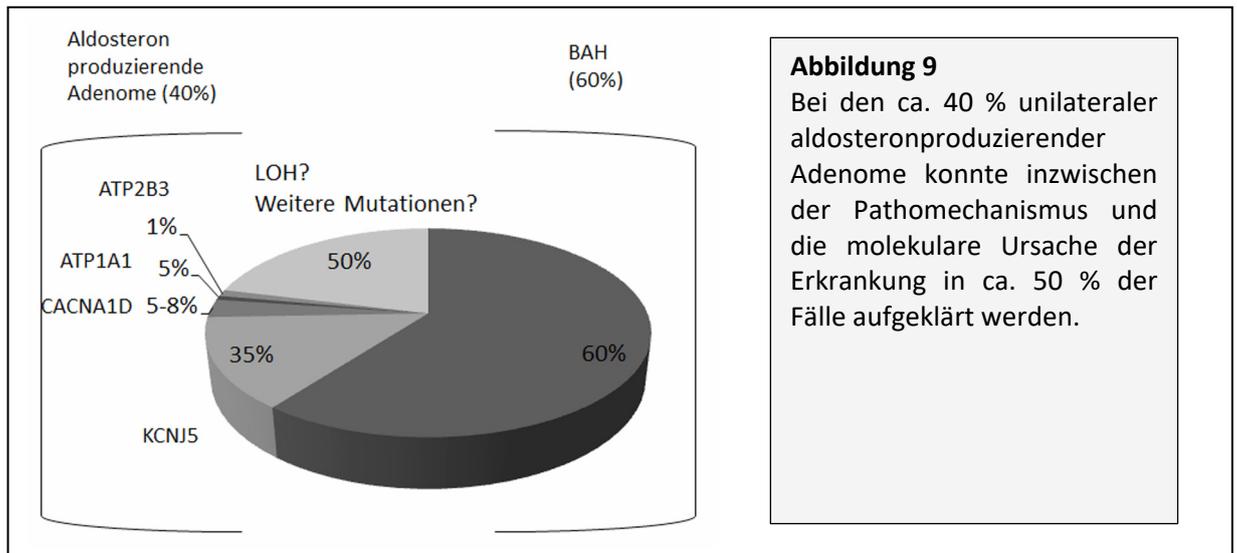
Trotz alledem finden sich aber auch Gemeinsamkeiten: Im Gegensatz zu einzelnen Arbeiten anderer Gruppen, die teilweise sogar gleichbleibende oder geringere CYP11B2 Expression in APA im Vergleich zu normalem Nebennierengewebe beobachtet haben<sup>28,40</sup>, zeigt sich bei uns sehr konstant über die verschiedenen Versuche hinweg, dass der primäre Hyperaldosteronismus hauptsächlich das Ergebnis einer erhöhten transkriptionellen Aktivierung oder einer Änderungen der mRNA Stabilität ist. Eine erhebliche Zunahme der Dicke der Zona glomerulosa in humanen APA und damit ein Tumormasseeffekt als Ursache für den Hyperaldosteronismus konnte hingegen in keinem der von uns durchgeführten Versuche beobachtet werden<sup>62</sup>. Das deckt sich auch mit der klinischen Erfahrung, dass relevante APA zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit bildgebenden Methoden aufgrund

ihrer kleinen Größe nicht immer zuverlässig dargestellt werden können.

Auf zellulärer Ebene konnten wir zeigen, dass mit erhöhter *CaMK I* und Aldosteronsynthase Expression wichtige bekannte physiologische Mechanismen der Aldosteronproduktion in APA aktiviert sind. Mittels Microarray im Mausmodell konnten unter anderem *Mtus1*, *Smoc1* und *Gpr48* als weitere relevant regulierte, bisher unbekannte Gene identifiziert werden. Zur Überprüfung der gefundenen Microarray-Kandidatengene *in vitro* bedienten wir uns der humanen Nebennierenkarzinomzelllinie NCI H295R, die wir näher als Modell der autonomen Aldosteronsekretion evaluierten. Diese zeichnet sich durch eine stabile Aldosteronsekretion aus, die sich vor allem mit Kalium spezifisch weiter stimulieren lässt. Die zu erwartenden Expressionsunterschiede ließen sich aber nur für einen Teil der im Microarray detektierten Gene, wie z.B. eine signifikante Herunterregulation von *MTUS1*, zeigen. Zusammen mit Real-time Untersuchungen in humanen APA ist die Expression von *MTUS1* als Folge des Hyperaldosteronismus zu interpretieren. Für *SPP1* ist aber durch eine verminderte Calciumbindung eine kausale Rolle möglich. Für dieses Gen hatte sich in früheren Untersuchungen ein Zusammenhang zur prähypertensiven Phase bei Hypertonikern herstellen lassen. Eine *Wwox* bedingte pathologische Überexpression von *Cyp11a1* kann ebenfalls diskutiert werden.

Mit der Entdeckung von *KCNJ5*-Mutationen in weit über 30 % der Fälle konnten in humanen APA erstmals Mutationen eines  $K^+$ -Kanals nachgewiesen werden, die durch Änderungen der Ionenhämostase zu einer permanenten Depolarisierung der Zelle mit konsekutiver dauerhafter Aktivierung der Aldosteronsynthase führen. Durch unsere Arbeiten mit derselben Screeningmethode, der Exomsequenzierung, gelang unserer Arbeitsgruppe nicht nur der Nachweis einer Ying Yang 1 Mutation bei Insulinomen, sondern auch die

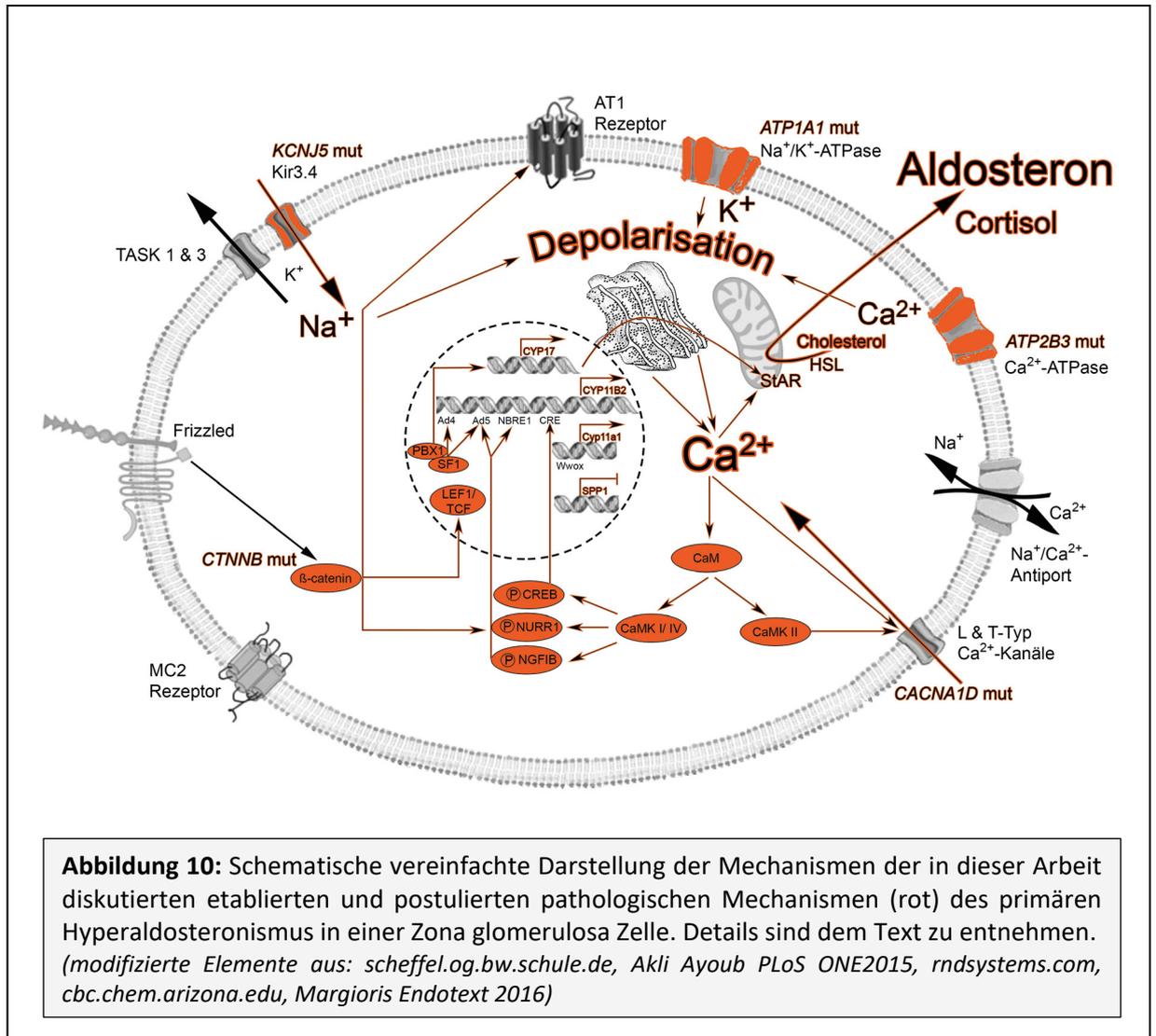
Identifizierung von Mutationen in den Genen *ATP1A1* und *ATP2B3* (6,8 % der Fälle) bei APA, die durch defekte ATPasen ebenfalls zur Depolarisation der Zelle führen. Zusammen mit der *CACNA1D* Calciumkanal-Mutation, die sich in 4,9 % der Fälle nachweisen ließ<sup>7,67</sup>, konnten innerhalb weniger Jahre die genetischen Ursachen und die Pathomechanismen von knapp 50 % aller sporadischen APA molekular aufgeklärt werden (Abbildung 9).



Neben der möglichst umfassenden Erforschung der zu Grunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen (Zusammenfassung: Abbildung 10) wird nun zunehmend die Suche nach Strategien oder Substanzen in den Fokus rücken, die z.B. die defekten Ionenkanäle blockieren können und somit therapeutisch nutzbar wären. Um diesem Ziel näher zu kommen, entwickelten wir ein Mausmodell zur nebennierenspezifischen Expression von mutiertem *KCNJ5*. Obwohl die Auswertung der Resultate noch nicht abgeschlossen ist, zeigen die transgenen Tiere die gewünschten spezifischen *KCNJ5* Expressionsunterschiede. Der erwartete schwere Hyperaldosteronismus hat sich aber nicht eingestellt, so dass hier zukünftig weitere Anläufe mit anderen Modellen und Konzepten unternommen werden müssen.

Wir arbeiteten heraus, dass der Transkriptionsfaktor *Pbx1* neben *SF1* nicht nur für die normale Nebennierenentwicklung essentiell ist, sondern auch beim adulten Organismus eine wesentliche Rolle spielt. Indem über *Pbx1* Bindungsstellen am *SF1* Promotor die *SF1* Expression verstärkt wird, wirken beide Faktoren synergistisch. *SF1* wurde in APA als überexprimiert beschrieben. Ebenso eine Aktivierung des Wnt Pathways mittels  $\beta$ -catenin Akkumulation, die zu einer vermehrten Expression gonadaler Gene führt. Interessanterweise wurde für Patienten mit APA und *KCNJ5* Mutation ein spezifisches Steroidprofil gefunden, ein „Fingerabdruck“ von 7 Steroiden, anhand dessen 92% der *KCNJ5*-Patienten korrekt identifiziert werden konnten und bei dem die zwei Hauptsteroide der Cortisolproduktion zuzuordnen sind<sup>78</sup>. Hierzu könnte auch der von uns näher untersuchten Transkriptionsfaktor *PBX1* in APA beitragen, ein wichtiger Regulator der für die Cortisolproduktion erforderlichen *CYP17*-Aktivität<sup>38,53,69</sup>. Schon länger ist bekannt, dass es, zumindest auf zellulärer Ebene, in APA zu einer Cortisol-Kosekretion kommen kann. Klinisch und laborchemisch schien dies bisher aber wenig relevant<sup>74</sup>. Womöglich wurde das Phänomen aber unterschätzt, zeigt sich doch in neueren Arbeiten, dass die Konzentration von Glukokortikoiden und deren Vorstufen bei APA der von Patienten mit subklinischem Cushing Syndrom ähneln kann und nur von Patienten, die an einem floriden Cushing-Syndrom leiden, übertroffen wird<sup>4,5</sup>. Hier wird künftig zu klären sein, wie valide die errechneten Quotienten beim selektiven Nebennierenvenenkatheter sind, bei dem bisher die Cortisolkonzentrationen zur Normalisierung der Aldosteronwerte herangezogen wird. Es ergeben sich aber noch weitere klinische Konsequenzen: Sind die beschriebenen erhöhte Osteoporoserate<sup>63</sup> und die kardiovaskulären Risikofaktoren bei APA Patienten möglicherweise zu einem großen Teil auf den Cortisolexzess zurückzuführen? Falls ja, wird man sich der Frage stellen müssen, ob die

erfolgreiche medikamentöse Therapie des Hyperaldosteronismus mittels Mineralkortikoidrezeptorantagonisten alleine ausreichend ist.



In jedem Fall ist davon auszugehen, dass die bisherige binäre Unterteilung in bilaterale adrenale Hyperplasie bzw. unilaterales Adenom sowie medikamentöse Therapie mit einem Mineralkortikoid Antagonisten bzw. Adrenalektomie zukünftig differenzierter erfolgen wird, hin zu einer auf die molekulare Ursache des individuellen Patienten zugeschnittenen spezifischeren Therapieform<sup>39</sup>.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Addison WN, Masica DL, Gray JJ, McKee MD. Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage. *J Bone Miner Res* 2010; 25:695-705
2. Aqeilan RI, Croce CM. WWOX in biological control and tumorigenesis. *J Cell Physiol* 2007; 212:307-310
3. Aqeilan RI, Hagan JP, de Bruin A, Rawahneh M, Salah Z, Gaudio E, Siddiqui H, Volinia S, Alder H, Lian JB, Stein GS, Croce CM. Targeted ablation of the WW domain-containing oxidoreductase tumor suppressor leads to impaired steroidogenesis. *Endocrinology* 2009; 150:1530-1535
4. Arlt W, Lang K, Sitch AJ, Dietz AS, Rhayem Y, Bancos I, Feuchtinger A, Chortis V, Gilligan LC, Ludwig P, Riester A, Asbach E, Hughes BA, O'Neil DM, Bidlingmaier M, Tomlinson JW, Hassan-Smith ZK, Rees DA, Adolf C, Hahner S, Quinkler M, Dekkers T, Deinum J, Biehl M, Keevil BG, Shackleton CHL, Deeks JJ, Walch AK, Beuschlein F, Reincke M. Steroid metabolome analysis reveals prevalent glucocorticoid excess in primary aldosteronism. *JCI Insight* 2017; 2
5. Asbach E, Williams TA, Reincke M. Recent Developments in Primary Aldosteronism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2016; 124:335-341
6. Azizan EA, Lam BY, Newhouse SJ, Zhou J, Kuc RE, Clarke J, Happerfield L, Marker A, Hoffman GJ, Brown MJ. Microarray, qPCR, and KCNJ5 sequencing of aldosterone-producing adenomas reveal differences in genotype and phenotype between zona glomerulosa- and zona fasciculata-like tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:E819-829
7. Azizan EA, Poulsen H, Tuluc P, Zhou J, Clausen MV, Lieb A, Maniero C, Garg S, Bochukova EG, Zhao W, Shaikh LH, Brighton CA, Teo AE, Davenport AP, Dekkers T, Tops B, Kusters B, Ceral J, Yeo GS, Neogi SG, McFarlane I, Rosenfeld N, Marass F, Hadfield J, Margas W, Chaggar K, Solar M, Deinum J, Dolphin AC, Farooqi IS, Striessnig J, Nissen P, Brown MJ. Somatic mutations in ATP1A1 and CACNA1D underlie a common subtype of adrenal hypertension. *Nat Genet* 2013; 45:1055-1060
8. Bassett MH, Mayhew B, Rehman K, White PC, Mantero F, Arnaldi G, Stewart PM, Bujalska I, Rainey WE. Expression profiles for steroidogenic enzymes in adrenocortical disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:5446-5455
9. Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, White PC, Rainey WE. The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production. *Mol Endocrinol* 2004; 18:279-290
10. Bassett MH, White PC, Rainey WE. The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 217:67-74
11. Berthon A, Drelon C, Ragazzon B, Boulkroun S, Tissier F, Amar L, Samson-Couterie B, Zennaro MC, Plouin PF, Skah S, Plateroti M, Lefebvre H, Sahut-Barnola I, Batisse-Lignier M, Assie G, Lefrancois-Martinez AM, Bertherat J, Martinez A, Val P. WNT/beta-catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Hum Mol Genet* 2014; 23:889-905
12. Beuschlein F, Boulkroun S, Osswald A, Wieland T, Nielsen HN, Lichtenauer UD, Penton D, Schack VR, Amar L, Fischer E, Walther A, Tauber P, Schwarzmayr T, Diener S, Graf E, Allolio B, Samson-Couterie B, Benecke A, Quinkler M, Fallo F, Plouin PF, Mantero F, Meitinger T, Mulatero P, Jeunemaitre X, Warth R, Vilsen B, Zennaro MC, Strom TM,

- Reincke M. Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. *Nat Genet* 2013; 45:440-444, 444e441-442
13. Beuschlein F, Fassnacht M, Assie G, Calebiro D, Stratakis CA, Osswald A, Ronchi CL, Wieland T, Sbiera S, Faucz FR, Schaak K, Schmittfull A, Schwarzmayr T, Barreau O, Vezzosi D, Rizk-Rabin M, Zabel U, Szarek E, Salpea P, Forlino A, Vetro A, Zuffardi O, Kisker C, Diener S, Meitinger T, Lohse MJ, Reincke M, Bertherat J, Strom TM, Allolio B. Constitutive activation of PKA catalytic subunit in adrenal Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 2014; 370:1019-1028
  14. Beuschlein F, Mutch C, Bavers DL, Ulrich-Lai YM, Engeland WC, Keegan C, Hammer GD. Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy. *Endocrinology* 2002; 143:3122-3135
  15. Bland ML, Jamieson CA, Akana SF, Bornstein SR, Eisenhofer G, Dallman MF, Ingraham HA. Haploinsufficiency of steroidogenic factor-1 in mice disrupts adrenal development leading to an impaired stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:14488-14493
  16. Boulkroun S, Beuschlein F, Rossi GP, Golib-Dzib JF, Fischer E, Amar L, Mulatero P, Samson-Couterie B, Hahner S, Quinkler M, Fallo F, Letizia C, Allolio B, Ceolotto G, Cicala MV, Lang K, Lefebvre H, Lenzini L, Maniero C, Monticone S, Perrocheau M, Pilon C, Plouin PF, Rayes N, Seccia TM, Veglio F, Williams TA, Zinamosca L, Mantero F, Benecke A, Jeunemaitre X, Reincke M, Zennaro MC. Prevalence, clinical, and molecular correlates of KCNJ5 mutations in primary aldosteronism. *Hypertension* 2012; 59:592-598
  17. Boulkroun S, Samson-Couterie B, Golib-Dzib JF, Amar L, Plouin PF, Sibony M, Lefebvre H, Louiset E, Jeunemaitre X, Meatchi T, Benecke A, Lalli E, Zennaro MC. Aldosterone-producing adenoma formation in the adrenal cortex involves expression of stem/progenitor cell markers. *Endocrinology* 2011; 152:4753-4763
  18. Boyd JE, Palmore WP, Mulrow PJ. Role of potassium in the control of aldosterone secretion in the rat. *Endocrinology* 1971; 88:556-565
  19. Bronstein JM, Farber DB, Wasterlain CG. Regulation of type-II calmodulin kinase: functional implications. *Brain Res Brain Res Rev* 1993; 18:135-147
  20. Cao CX, Yang XC, Gao YX, Zhuang M, Wang KP, Sun LJ, Wang XS. Expression of aldosterone synthase and adrenocorticotrophic hormone receptor in adrenal incidentalomas from normotensive and hypertensive patients: Distinguishing subclinical or atypical primary aldosteronism from adrenal incidentaloma. *Int J Mol Med* 2012; 30:1396-1402
  21. Chen M, Hornsby PJ. Adenovirus-delivered DKK3/WNT4 and steroidogenesis in primary cultures of adrenocortical cells. *Horm Metab Res* 2006; 38:549-555
  22. Choi M, Scholl UI, Yue P, Bjorklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, Ji W, Cho Y, Patel A, Men CJ, Lolis E, Wisgerhof MV, Geller DS, Mane S, Hellman P, Westin G, Akerstrom G, Wang W, Carling T, Lifton RP. K<sup>+</sup> channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* 2011; 331:768-772
  23. Condon JC, Pezzi V, Drummond BM, Yin S, Rainey WE. Calmodulin-dependent kinase I regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase. *Endocrinology* 2002; 143:3651-3657
  24. Conn JW. Aldosteronism and hypertension. Primary aldosteronism versus hypertensive disease with secondary aldosteronism. *Arch Intern Med* 1961; 107:813-828
  25. Davies LA, Hu C, Guagliardo NA, Sen N, Chen X, Talley EM, Carey RM, Bayliss DA, Barrett PQ. TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:2203-2208

26. Dierks A, Lichtenauer UD, Sackmann S, Spyroglou A, Shapiro I, Geyer M, Manonopoulou J, Reincke M, Hantel C, Beuschlein F. Identification of adrenal genes regulated in a potassium-dependent manner. *J Mol Endocrinol* 2010; 45:193-206
27. Eide IK, Torjesen PA, Drolsum A, Babovic A, Lilledahl NP. Low-renin status in therapy-resistant hypertension: a clue to efficient treatment. *J Hypertens* 2004; 22:2217-2226
28. Enberg U, Volpe C, Hoog A, Wedell A, Farnebo LO, Thoren M, Hamberger B. Postoperative differentiation between unilateral adrenal adenoma and bilateral adrenal hyperplasia in primary aldosteronism by mRNA expression of the gene CYP11B2. *Eur J Endocrinol* 2004; 151:73-85
29. Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, Stowasser M, Young WF, Jr. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101:1889-1916
30. Gao Y, Kitagawa K, Hiramatsu Y, Kikuchi H, Isobe T, Shimada M, Uchida C, Hattori T, Oda T, Nakayama K, Nakayama KI, Tanaka T, Konno H, Kitagawa M. Up-regulation of GPR48 induced by down-regulation of p27Kip1 enhances carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Cancer Res* 2006; 66:11623-11631
31. Hannemann A, Bidlingmaier M, Friedrich N, Manolopoulou J, Spyroglou A, Volzke H, Beuschlein F, Seissler J, Rettig R, Felix SB, Biffar R, Doring A, Meisinger C, Peters A, Wichmann HE, Nauck M, Wallaschofski H, Reincke M. Screening for primary aldosteronism in hypertensive subjects: results from two German epidemiological studies. *Eur J Endocrinol* 2012; 167:7-15
32. Heikkila M, Peltoketo H, Leppaluoto J, Ilves M, Vuolteenaho O, Vainio S. Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. *Endocrinology* 2002; 143:4358-4365
33. Heist EK, Schulman H. The role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases within the nucleus. *Cell Calcium* 1998; 23:103-114
34. Heist EK, Srinivasan M, Schulman H. Phosphorylation at the nuclear localization signal of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II blocks its nuclear targeting. *J Biol Chem* 1998; 273:19763-19771
35. Hu C, Rusin CG, Tan Z, Guagliardo NA, Barrett PQ. Zona glomerulosa cells of the mouse adrenal cortex are intrinsic electrical oscillators. *J Clin Invest* 2012; 122:2046-2053
36. Jung J, Barrett PQ, Eckert GJ, Edenberg HJ, Xuei X, Tu W, Pratt JH. Variations in the potassium channel genes KCNK3 and KCNK9 in relation to blood pressure and aldosterone production: an exploratory study. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:E2160-2167
37. Kagawa N, Ogo A, Takahashi Y, Iwamatsu A, Waterman MR. A cAMP-regulatory sequence (CRS1) of CYP17 is a cellular target for the homeodomain protein Pbx1. *J Biol Chem* 1994; 269:18716-18719
38. Karashima S, Takeda Y, Cheng Y, Yoneda T, Demura M, Kometani M, Ohe M, Mori S, Yagi K, Yamagishi M. Clinical characteristics of primary hyperaldosteronism due to adrenal microadenoma. *Steroids* 2011; 76:1363-1366
39. Lenders JWM, Eisenhofer G, Reincke M. Subtyping of Patients with Primary Aldosteronism: An Update. *Horm Metab Res* 2017; 49:922-928
40. Lenzini L, Seccia TM, Aldighieri E, Belloni AS, Bernante P, Giuliani L, Nussdorfer GG, Pessina AC, Rossi GP. Heterogeneity of aldosterone-producing adenomas revealed by a whole transcriptome analysis. *Hypertension* 2007; 50:1106-1113

41. Lichtenauer U, Shapiro I, Sackmann S, Drouin J, Scheele J, Maneck M, Klein C, Beuschlein F. The side population phenomenon enriches for designated adrenocortical progenitor cells in mice. *J Endocrinol* 2012; 215:383-391
42. Lichtenauer UD, Di Dalmazi G, Slater EP, Wieland T, Kuebart A, Schmittfull A, Schwarzmayr T, Diener S, Wiese D, Thasler WE, Reincke M, Meitinger T, Schott M, Fassnacht M, Bartsch DK, Strom TM, Beuschlein F. Frequency and clinical correlates of somatic *Ying Yang 1* mutations in sporadic insulinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;jc20151100
43. Lichtenauer UD, Duchniewicz M, Kolanczyk M, Hoeflich A, Hahner S, Else T, Bicknell AB, Zemojtel T, Stallings NR, Schulte DM, Kamps MP, Hammer GD, Scheele JS, Beuschlein F. Pre-B-cell transcription factor 1 and steroidogenic factor 1 synergistically regulate adrenocortical growth and steroidogenesis. *Endocrinology* 2007; 148:693-704
44. Lichtenauer UD, Shapiro I, Osswald A, Meurer S, Kulle A, Reincke M, Riepe F, Beuschlein F. Characterization of NCI-H295R cells as an in vitro model of hyperaldosteronism. *Horm Metab Res* 2013; 45:124-129
45. Lotshaw DP. Role of membrane depolarization and T-type Ca<sup>2+</sup> channels in angiotensin II and K<sup>+</sup> stimulated aldosterone secretion. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 175:157-171
46. Manichaikul A, Rich SS, Allison MA, Guagliardo NA, Bayliss DA, Carey RM, Barrett PQ. *KCNK3* Variants Are Associated With Hyperaldosteronism and Hypertension. *Hypertension* 2016; 68:356-364
47. Marques FZ, Campain AE, Yang YH, Morris BJ. Meta-analysis of genome-wide gene expression differences in onset and maintenance phases of genetic hypertension. *Hypertension* 2010; 56:319-324
48. Matthews EK, Saffran M. Ionic dependence of adrenal steroidogenesis and ACTH-induced changes in the membrane potential of adrenocortical cells. *J Physiol* 1973; 234:43-64
49. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45:1243-1248
50. Newton-Cheh C, Guo CY, Gona P, Larson MG, Benjamin EJ, Wang TJ, Kathiresan S, O'Donnell CJ, Musone SL, Camargo AL, Drake JA, Levy D, Hirschhorn JN, Vasan RS. Clinical and genetic correlates of aldosterone-to-renin ratio and relations to blood pressure in a community sample. *Hypertension* 2007; 49:846-856
51. Nishimoto K, Nakagawa K, Li D, Kosaka T, Oya M, Mikami S, Shibata H, Itoh H, Mitani F, Yamazaki T, Ogishima T, Suematsu M, Mukai K. Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:2296-2305
52. Nogueira EF, Gerry D, Mantero F, Mariniello B, Rainey WE. The role of *TASK1* in aldosterone production and its expression in normal adrenal and aldosterone-producing adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010; 73:22-29
53. Nomura K, Naruse M, Naruse K, Demura H, Shizume K. In vivo evidence of cortisol secretion by aldosterone-producing adenomas. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1984; 106:516-520
54. Ogo A, Waterman MR, McAllister JM, Kagawa N. The homeodomain protein *Pbx1* is involved in cAMP-dependent transcription of human *CYP17*. *Arch Biochem Biophys* 1997; 348:226-231
55. Ohno Y, Sone M, Inagaki N, Yamasaki T, Ogawa O, Takeda Y, Kurihara I, Itoh H, Umakoshi H, Tsuiki M, Ichijo T, Katabami T, Tanaka Y, Wada N, Shibayama Y, Yoshimoto T, Ogawa Y, Kawashima J, Takahashi K, Fujita M, Watanabe M, Matsuda Y, Kobayashi H, Shibata H,

- Kamemura K, Otsuki M, Fujii Y, Yamamoto K, Ogo A, Okamura S, Miyauchi S, Fukuoka T, Izawa S, Yoneda T, Hashimoto S, Yanase T, Suzuki T, Kawamura T, Tabara Y, Naruse M, Nagahama S, Group JS. Prevalence of Cardiovascular Disease and Its Risk Factors in Primary Aldosteronism: A Multicenter Study in Japan. *Hypertension* 2018;
56. Ouyang J, Hu D, Wang B, Shi T, Ma X, Li H, Wang X, Zhang X. Differential effects of down-regulated steroidogenic factor-1 on basal and angiotensin II-induced aldosterone secretion. *J Endocrinol Invest* 2011; 34:671-675
  57. Parmar J, Key RE, Rainey WE. Development of an adrenocorticotropin-responsive human adrenocortical carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:4542-4546
  58. Pezzi V, Clyne CD, Ando S, Mathis JM, Rainey WE. Ca(2+)-regulated expression of aldosterone synthase is mediated by calmodulin and calmodulin-dependent protein kinases. *Endocrinology* 1997; 138:835-838
  59. Reincke M, Fischer E, Gerum S, Merkle K, Schulz S, Pallauf A, Quinkler M, Hanslik G, Lang K, Hahner S, Allolio B, Meisinger C, Holle R, Beuschlein F, Bidlingmaier M, Endres S, German Conn's Registry-Else Kroner-Fresenius-Hyperaldosteronism R. Observational study mortality in treated primary aldosteronism: the German Conn's registry. *Hypertension* 2012; 60:618-624
  60. Reincke M, Sbiera S, Hayakawa A, Theodoropoulou M, Osswald A, Beuschlein F, Meitinger T, Mizuno-Yamasaki E, Kawaguchi K, Saeki Y, Tanaka K, Wieland T, Graf E, Saeger W, Ronchi CL, Allolio B, Buchfelder M, Strom TM, Fassnacht M, Komada M. Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease. *Nat Genet* 2015; 47:31-38
  61. Rossi GP, Bernini G, Caliumi C, Desideri G, Fabris B, Ferri C, Ganzaroli C, Giacchetti G, Letizia C, Maccario M, Mallamaci F, Mannelli M, Mattarello MJ, Moretti A, Palumbo G, Parenti G, Porteri E, Semplicini A, Rizzoni D, Rossi E, Boscaro M, Pessina AC, Mantero F, Investigators PS. A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48:2293-2300
  62. Sackmann S, Lichtenauer U, Shapiro I, Reincke M, Beuschlein F. Aldosterone producing adrenal adenomas are characterized by activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) dependent pathways. *Horm Metab Res* 2011; 43:106-111
  63. Salcuni AS, Palmieri S, Carnevale V, Morelli V, Battista C, Guarnieri V, Guglielmi G, Desina G, Eller-Vainicher C, Beck-Peccoz P, Scillitani A, Chiodini I. Bone involvement in aldosteronism. *J Bone Miner Res* 2012; 27:2217-2222
  64. Saruta T, Kondo K, Saito I, Misumi J, Nakamura R, Kidokoro S, Matsuki S. [Effects of low salt plus upright posture, angiotensin II, ACTH, and potassium upon plasma renin activity, aldosterone, and cortisol (author's transl)]. *Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi* 1975; 51:740-744
  65. Sausbier M, Arntz C, Bucurenciu I, Zhao H, Zhou XB, Sausbier U, Feil S, Kamm S, Essin K, Sailer CA, Abdullah U, Krippeit-Drews P, Feil R, Hofmann F, Knaus HG, Kenyon C, Shipston MJ, Storm JF, Neuhuber W, Korth M, Schubert R, Gollasch M, Ruth P. Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation* 2005; 112:60-68
  66. Schnabel CA, Selleri L, Cleary ML. Pbx1 is essential for adrenal development and urogenital differentiation. *Genesis* 2003; 37:123-130
  67. Scholl UI, Goh G, Stolting G, de Oliveira RC, Choi M, Overton JD, Fonseca AL, Korah R, Starker LF, Kunstman JW, Prasad ML, Hartung EA, Mauras N, Benson MR, Brady T, Shapiro JR, Loring E, Nelson-Williams C, Libutti SK, Mane S, Hellman P, Westin G, Akerstrom G, Bjorklund P, Carling T, Fahlke C, Hidalgo P, Lifton RP. Somatic and germline

- CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. *Nat Genet* 2013; 45:1050-1054
68. Soderling TR. The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem Sci* 1999; 24:232-236
  69. Spath M, Korovkin S, Antke C, Anlauf M, Willenberg HS. Aldosterone- and cortisol-co-secreting adrenal tumors: the lost subtype of primary aldosteronism. *Eur J Endocrinol* 2011; 164:447-455
  70. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol* 2002; 161:2035-2046
  71. Stowasser M, Sharman J, Leano R, Gordon RD, Ward G, Cowley D, Marwick TH. Evidence for abnormal left ventricular structure and function in normotensive individuals with familial hyperaldosteronism type I. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:5070-5076
  72. Swulius MT, Waxham MN. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:2637-2657
  73. Teo AE, Garg S, Shaikh LH, Zhou J, Karet Frankl FE, Gurnell M, Happerfield L, Marker A, Bienz M, Azizan EA, Brown MJ. Pregnancy, Primary Aldosteronism, and Adrenal CTNNB1 Mutations. *N Engl J Med* 2015; 373:1429-1436
  74. Tunny TJ, Klemm SA, Gordon RD. Some aldosterone-producing adrenal tumours also secrete cortisol, but present clinically as primary aldosteronism. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1990; 17:167-171
  75. van Leeuwen N, Caprio M, Blaya C, Fumeron F, Sartorato P, Ronconi V, Giacchetti G, Mantero F, Fernandes-Rosa FL, Simian C, Peyrard S, Zitman FG, Penninx BW, de Kloet ER, Azizi M, Jeunemaitre X, Derijk RH, Zennaro MC. The functional c.-2G>C variant of the mineralocorticoid receptor modulates blood pressure, renin, and aldosterone levels. *Hypertension* 2010; 56:995-1002
  76. Wang T, Rowland JG, Parmar J, Nesterova M, Seki T, Rainey WE. Comparison of aldosterone production among human adrenocortical cell lines. *Horm Metab Res* 2012; 44:245-250
  77. Williams TA, Lenders JWM, Mulatero P, Burrello J, Rottenkolber M, Adolf C, Satoh F, Amar L, Quinkler M, Deinum J, Beuschlein F, Kitamoto KK, Pham U, Morimoto R, Umakoshi H, Prejbisz A, Kocjan T, Naruse M, Stowasser M, Nishikawa T, Young WF, Jr., Gomez-Sanchez CE, Funder JW, Reincke M. Primary Aldosteronism Surgery Outcome i. Outcomes after adrenalectomy for unilateral primary aldosteronism: an international consensus on outcome measures and analysis of remission rates in an international cohort. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2017; 5:689-699
  78. Williams TA, Peitzsch M, Dietz AS, Dekkers T, Bidlingmaier M, Riester A, Treitl M, Rhayem Y, Beuschlein F, Lenders JW, Deinum J, Eisenhofer G, Reincke M. Genotype-Specific Steroid Profiles Associated With Aldosterone-Producing Adenomas. *Hypertension* 2016; 67:139-145
  79. Zubair M, Ishihara S, Oka S, Okumura K, Morohashi K. Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development: initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 complex and maintenance via autoregulation by Ad4BP/SF-1. *Mol Cell Biol* 2006; 26:4111-4121

## 6 Auflistung der eigenen Publikationen dieser Habilitationsschrift

**Lichtenauer UD**, Duchniewicz M, Kolanczyk M, Hoeflich A, Hahner S, Else T, Bicknell AB, Zemojtel T, Stallings NR, Schulte DM, Kamps MP, Hammer GD, Scheele JS, Beuschlein F 2007. Pre-B-cell transcription factor 1 and steroidogenic factor 1 synergistically regulate adrenocortical growth and steroidogenesis. *Endocrinology* 148:693-704.

Dierks A\*, **Lichtenauer UD\***, Sackmann S, Spyroglou A, Shapiro I, Geyer M, Manonopoulou J, Reincke M, Hantel C, Beuschlein F 2010. Identification of adrenal genes regulated in a potassium-dependent manner. *J Mol Endocrinol* 45:193-206.

Sackmann S, **Lichtenauer U**, Shapiro I, Reincke M, Beuschlein F. 2011. Aldosterone producing adrenal adenomas are characterized by activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) dependent pathways. *Horm Metab Res* 43(2):106-11.

**Lichtenauer UD**, Shapiro I, Osswald A, Meurer S, Kulle A, Reincke M, Riepe F, Beuschlein F. 2013 Characterization of NCI-H295R cells as an in vitro model of hyperaldosteronism. *Horm Metab Res* 45:124-129.

Beuschlein F, Boulkroun S, Osswald A, Wieland T, Nielsen HN, **Lichtenauer UD**, Penton D, Schack VR, Amar L, Fischer E, Walther A, Tauber P, Schwarzmayr T, Diener S, Graf E, Allolio B, Samson-Couterie B, Benecke A, Quinkler M, Fallo F, Plouin PF, Mantero F, Meitinger T, Mulatero P, Jeunemaitre X, Warth R, Vilsen B, Zennaro MC, Strom TM, Reincke M 2013 Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. *Nat Genet* 45:440-444, 444e441-442.

**Lichtenauer UD\***, Di Dalmazi G\*, Slater EP, Wieland T, Kuebart A, Schmittfull A, Schwarzmayr T, Diener S, Wiese D, Thasler WE, Reincke M, Meitinger T, Schott M, Fassnacht M, Bartsch DK, Strom TM, Beuschlein F. 2015. Frequency and clinical correlates of somatic Ying Yang 1 mutations in sporadic insulinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 100(5):E776-82.

\*= Erstautoren