

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian–Albrechts-Universität zu Kiel

Direktor: Prof. Dr. med. Schrappe

Funktionelle Charakterisierung 8 neuer Mutationen des CYP11B2 Gens

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
vorgelegt von
DOROTHEA GÖTZE
aus Clausthal-Zellerfeld
Kiel 2011

1. Berichtstatter: *Priv. Dozent Dr. F. Riepe*
2. Berichtstatter: *Prof. Dr. Mönig*
Tag der mündlichen Prüfung: *1. November 2012*
Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.:
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	SYNTHESE UND ABBAU DES ALDOSTERONS	6
1.2	REGULATION UND WIRKUNG	8
1.3	ALDOSTERONSYNTHASEMANGEL	9
1.3.1	<i>Klinik des Aldosteronsynthasemangels</i>	10
1.3.2	<i>Therapie</i>	11
1.4	MOLEKULARGENETISCHE GRUNDLAGEN DER ALDOSTERONSYNTHASE	11
1.5	MUTATIONEN IM CYP11B2 GEN	12
2	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	13
3	MATERIAL UND METHODEN	14
3.1	PATIENTEN	14
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	15
3.2.1	<i>Mutagenese</i>	15
3.2.2	<i>Sequenzierung</i>	16
3.2.3	<i>Subklonierung in den pcDNA3-Vektor</i>	17
3.3	IN VITRO EXPRESSIONSANALYSE IM EUKARYONTISCHEN EXPRESSIONSSYSTEM	18
3.3.1	<i>Transiente Transfektion von COS 7-Zellen</i>	18
3.3.2	<i>Hormoninkubation und Dünnschichtchromatographie</i>	19
3.3.3	<i>Statistische Auswertung</i>	19
3.4	PROTEINANALYSE	20
3.4.1	<i>Proteinbestimmung nach Bradford</i>	20
3.4.2	<i>Western-Blot</i>	20
3.5	IMMUNFLUORESCENZ	21
3.6	ALIGNMENTS DER PROTEINSEQUENZ DER ALDOSTERONSYNTHASE	22
3.7	ANALYSE DER ALLELFREQUENZ	22
3.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG	23
4	ERGEBNISSE	24
4.1	MUTATIONSANALYSE	24
4.2	WESTERN BLOT	27
4.3	IMMUNFLUORESCENZEN	28
4.4	EXPRESSIONSANALYSE UND AKTIVITÄTSMESSUNG	28
4.5	ALIGNMENTS DER ALDOSTERONSYNTHASE ZWISCHEN VERSCHIEDENEN SPEZIES	30

4.6	ALLELFREQUENZ DER POLYMORPHISMEN.....	32
5	DISKUSSION	33
5.1	GENOTYPEN.....	33
5.2	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN DER MUTATIONEN.....	34
5.3	PRÄVALENZ DES POLYMORPHISMUS I339T.....	36
6	ZUSAMMENFASSUNG	38
7	ANHANG	39
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	45
9	TABELLENVERZEICHNIS	46
10	LITERATURVERZEICHNIS.....	47
11	DANKSAGUNG	50
12	LEBENS LAUF.....	51

Abkürzungsverzeichnis

18-OH-B	18-Desoxycorticosteron
AB	Applied Biosystems
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Adx	Adrenodoxin
AR	Adrenodoxinreduktase
AS	Aminosäure
AMS	Aldosteronmangelsyndrom
B	Corticosteron
BSA	Bovines Serumalbumin
CDP-Star	Disodium 2-Chloro-5-Phenylphosphat-Star
CMV	Cytomegalievirus
ddNTP	2',3'-Didesoxynucleotidtriphosphat
DHEA/ DHEA-S	Dehydroepiandrosteron/ DHEA-Sulfat
DOC	Desoxycorticosteron
ECO RI	Restriktionsenzym
FCS	fetales Kälberserum
LB	Lysogeny Broth
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
SNP	Single nucleotid polymorphism
TBS	Tris-gepufferte Salzmischung
TLC	Dünnschichtchromatographie
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Die Nebennierenrinde produziert drei Arten von Steroidhormonen: Glucocorticoide, Androgene und Mineralocorticoide. Diese Hormone greifen in die Regulation verschiedener Systeme des Körpers ein, wie z.B. den Salz- und Wasserhaushalt, den Metabolismus der Proteine, Kohlenhydrate und der Lipide, und die Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale.

Bei kongenitalen Störungen der Steroidbiosynthese, handelt es sich meist um genetisch bedingte Defekte verschiedener Enzyme, welche einen gestörten Syntheseweg zur Folge haben. So können die Endprodukte dieses Weges vermindert, die Zwischenprodukte jedoch erhöht sein.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Gendefekten des *CYP11B2-Gens*, welche einen Aldosteronsynthesemangel und daraus folgend einen angeborenen, isolierten Hypoaldosteronismus bedingen.

1.1 Synthese und Abbau des Aldosterons

Die Nebennierenrinde unterteilt sich in 3 Zonen, in denen auf Grund verschiedener Enzymausstattungen die unterschiedlichen Steroidhormone gebildet werden (vgl. Abb. 1).

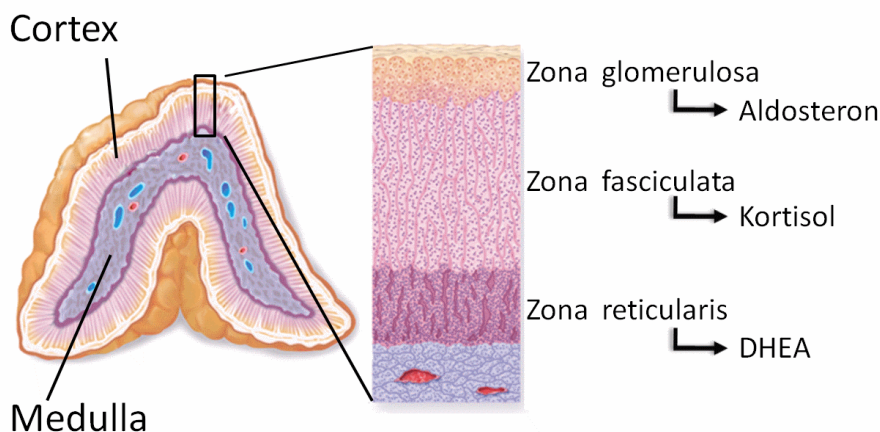


Abbildung 1: Aufbau der Nebennierenrinde (Quelle: Dr. Nils Krone)

In der Zona glomerulosa werden Mineralokortikoide synthetisiert, Glukokortikoide werden in der Zona fasciculata produziert und die Synthese der Androgene findet in der Zona reticularis statt.

Auf Grund der fehlenden 17α -Hydroxylase-Aktivität, kann in der Zona glomerulosa kein

Cortisol entstehen. Umgekehrt fehlt die Aldosteronsyntheseaktivität in der Zona fasciculata. Somit kann dort auch kein Aldosteron synthetisiert werden [1].

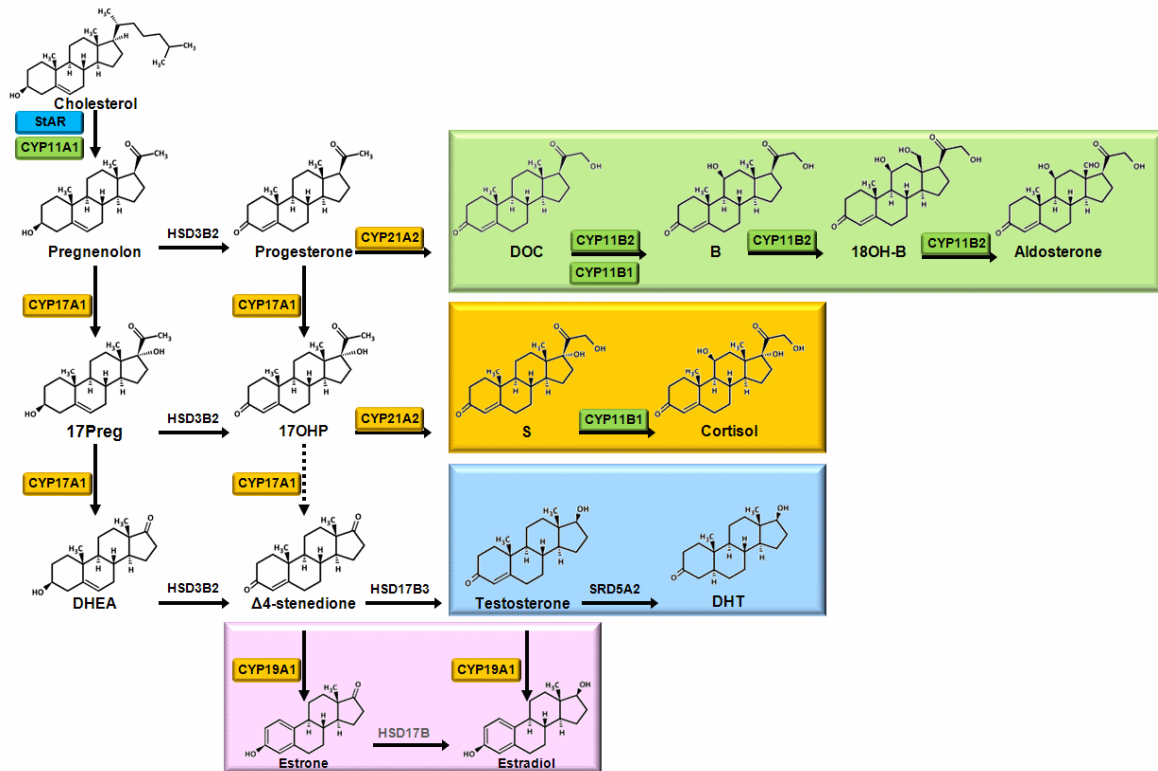


Abbildung 2: Steroidbiosynthese

Nach Aufnahme von Cholesterin aus dem Blut über zirkulierende Lipoproteinpartikel oder der De-novo-Synthese aus Acetyl-Coenzym A in den NNR-Zellen, wird es zur inneren Mitochondrienmembran transportiert. Dort wird es durch die Cholesterindesmolase (CYP11A1) unter Abspaltung einer Seitenkette zu Pregnenolon umgewandelt. Nach Transport des Pregnenolon in das Zytosol wird dieses durch Oxidation (HSD3B2) in Progesteron umgewandelt. Durch die Katalyse mit der 21-Hydroxylase (CYP21A2) entsteht das Zwischenprodukt 11-Desoxycorticosteron (DOC), welches in den Versuchen dieser Arbeit als Substrat diente. Durch weitere Metabolisierung durch die Aldosteronsynthase (CYP11B2) entsteht über eine 11 β -Hydroxylierung Corticosteron (B), durch eine 18-Hydroxylierung 18-OH-Corticosteron (18-OH-B) und letztendlich Aldosteron durch eine 18-Oxidation [2] (Abb. 2).

Der Abbau erfolgt durch zweifache Reduktion zu Tetrahydroaldosteron. Dieses wird entweder direkt über den Urin ausgeschieden, oder vorher an Glukuronsäure gekoppelt und so ausgeschieden. Ein geringer Anteil wird ohne vorherige Reduktion direkt an Glukuronsäure gebunden und ausgeschieden.

1.2 Regulation und Wirkung

Die Aldosteronsynthese wird hauptsächlich durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und die Kaliumkonzentration gesteuert. Andere Faktoren wie z.B. die Natriumkonzentration im Blut, Corticotropin oder Vasopressin haben einen untergeordneten Einfluß auf die Synthese.

Sinkt im Plasma die Natrium-Konzentration oder fällt der Blutdruck ab, wird im juxtaglomerulären Apparat der Niere das Enzym Renin freigesetzt. Dieses katalysiert die Metabolisierung des in der Leber gebildeten Prohormons Angiotensinogen zu Angiotensin I, welches durch das Angiotensin-Converting-Enzyme in Angiotensin II umgewandelt wird. Angiotensin II bindet an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, aktiviert dadurch die Expression des *CYP11B2*-Genes sowie dessen Translation und so die Synthese von Aldosteron aus Cholesterin.

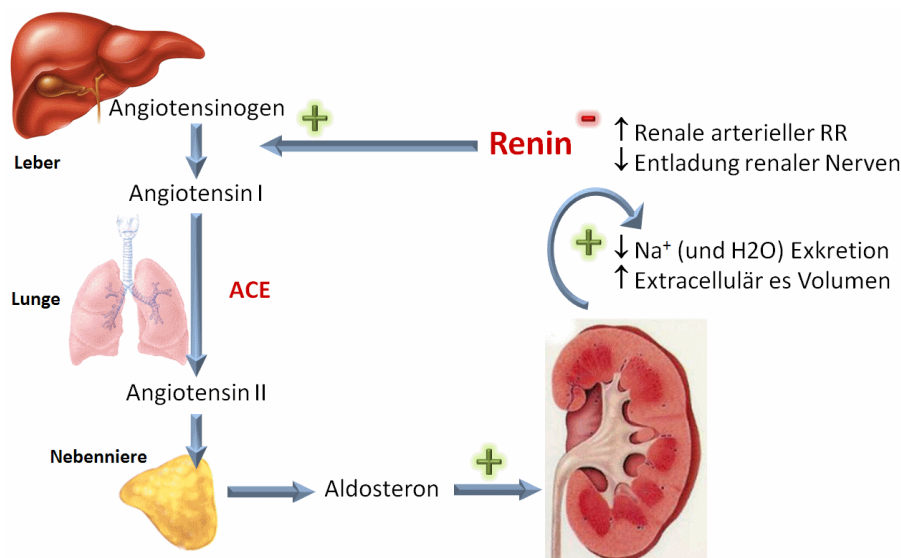


Abbildung 3: Renin-Angiotensin-Aldosteron System (Quelle: Dr. Nils Krone)

Steigt die Kaliumkonzentration im Blut, depolarisieren die Zellmembranen vermehrt und lassen so einen erhöhten Calcium-Einstrom zu. Intrazelluläres Calcium erregt die gleichen Rezeptoren wie Angiotensin II und fördert durch den o.g. Mechanismus die Aldosteronbildung.

Im Säuglingsalter ist auch eine direkte Stimulation über ACTH möglich.

Aldosteron ist das potenteste Mineralocorticoid. Sein Vorläufer DOC hat ebenfalls eine Mineralokortikoid-Wirkung, jedoch nur mit einer Effizienz von 3% des Aldosterons.

Aufgrund seiner lipophilen Struktur entfaltet Aldosteron seine Wirkung über einen intrazellulär gelegenen Rezeptor und beeinflusst über DNA-Bindung die Expression und Translation bestimmter Natrium-retenierender Faktoren.

So werden z.B. in der Niere apikal gelegene Natrium-Kanäle, die Na-K-ATPase und einige Enzyme des Citratcyclus vermehrt exprimiert. Daraus resultiert eine vermehrte Resorption von Natrium und eine vermehrte Ausscheidung von Kalium-, Wasserstoff- und Ammoniumionen. Aus Gründen des Ladungsgleichgewichtes kommt es zusätzlich zu einer transzellulären Chlorid-Resorption, folglich zu einem passiven Wassereinstrom. Dies geht mit einer Erhöhung des extrazellulären Volumens einher und der Blutdruck wird stabilisiert, bzw. der Wasserhaushalt reguliert. Die Wirkung entfaltet sich erst nach einigen Stunden, da die Transkription beeinflusst wird [3].

An anderen Wirkorten, wie den Schweißdrüsen, Speicheldrüsen und im Intestinaltrakt wird die Ausscheidung von Natriumionen verlangsamt.

1.3 Aldosteronsynthesemangel

Befindet sich auf dem *CYP11B2-Gen*, welches die Aldosteronsynthase kodiert, eine Mutation, kommt es zu einem isolierten Defekt der Aldosteronsynthese. Fällt die Enzymaktivität auf <1% ab, wird die Aldosteronbiosynthese beeinträchtigt [4]. In den meisten Fällen wird das Aldosteronsynthesemangelsyndrom (ASM) autosomal-rezessiv vererbt.

Bei der Analyse der Steroidmetaboliten im Urin und der Hormonvorstufen im Plasma finden sich unterschiedliche Profile derselben und der Defekt kann in einen ASM Typ I und Typ II unterteilt werden [5, 6].

Beiden Typen gleich ist, dass die Aldosteronwerte vermindert, die Corticosteronlevel im Plasma erhöht sind (Siehe Tabelle 2 im Anhang). Da beim ASM-Typ I die 18-Hydroxylaseaktivität vermindert ist, findet man dort verminderte Level an 18-OH-B im Plasma. Der ASM-Typ II weist hingegen erhöhte Werte von 18-OH-B auf [7, 8]. Die Vorstufen der Cortisolbiosynthese liegen im Normbereich.

Aussagekräftiger als der einzelne Steroid- und Metabolitnachweis im Urin und im Plasma, zur Unterscheidung beider Typen, sind die Quotienten von Corticosteron zu 18-Hydroxycorticosteron und 18-Hydroxycorticosteron zu Aldosteron. Der erste Quotient ist beim ASM-Typ I durch die niedrigen 18-Hydroxycorticosteron-Werte >40 , beim ASM-Typ II <10 . Der zweite Quotient ist ungenauer, da das Aldosteron häufig unterhalb der Nachweisgrenze liegt [7].

Der isolierte Aldosteronsynthesemangel ist eine, im Vergleich zu anderen Defekten der Steroidsynthese, relativ seltene Erkrankung. Die genaue Häufigkeit konnte bisher noch nicht weiter eingeschätzt werden [9] Es wird jedoch angenommen, dass eine gewisse Häufung bei Juden iranischer Herkunft besteht [10]. Die Erkrankung ist aber auch in Europa und Amerika beschrieben worden [5].

1.3.1 Klinik des Aldosteronsynthesemangels

Die Neugeborenen fallen nach der Geburt durch Gewichtsabnahme auf. Es tritt ein Salzverlustsyndrom auf, welches sich durch Erbrechen, Gedeihstörung, Durchfälle und intermittierendes Fieber äußert. Im Labor sind eine Hyperkaliämie, Hyponatriämie, eine erhöhte Plasma-Renin-Aktivität und eine metabolische Azidose zu erkennen [7]. Dadurch kann ein hypovolämischer Schock hervorgerufen werden (s. Tabelle 2 im Anhang).

Der Schweregrad des Salzverlustes klingt im weiteren Krankheitsverlauf ab und die Patienten werden im jungen Erwachsenenalter häufig symptomfrei, auch wenn sie nicht mehr therapiert werden [11]. Die Elektrolytstörungen gehen zurück, nicht jedoch die laborbiochemischen Auffälligkeiten in der Steroidanalyse. Weiter können die Patienten Natriumverluste z.B. bei heißem Wetter schlechter kompensieren als gesunde Menschen.

Als Ursache für den Rückgang der Elektrolytstörungen werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Mit steigendem Alter steigt die Natriumaufnahme über die Nahrung, außerdem sinkt der Bedarf mit nachlassender Wachstumsgeschwindigkeit. Es werden Aldosteron-unabhängige Mechanismen zur Natriumretention angenommen, die über intrarenale und extrarenale Kompensationsmechanismen (z.B. über Haut und Schweißdrüsen) die Elektrolyte stabilisieren.

1.3.2 Therapie

Ziel der Therapie ist eine Normalisierung der Plasmaelektrolyte der Säuglinge. Dies wird durch die Gabe von 9α -Fluorcortisol, ein synthetisches Mineralocorticoid, erreicht. Weiter kann Natrium oral substituiert werden. Nach Beginn der Therapie können die Plasma-Renin-Aktivität und die Werte der Steroid-Vorstufen des Aldosterons noch einige Monate erhöht bleiben. Die Dauer der Therapie wird kontrovers diskutiert. Über die Adoleszenz hinaus müssen die Patienten jedoch häufig nicht therapiert werden [11].

1.4 Molekulargenetische Grundlagen der Aldosteronsynthese

Die Studien zu den verschiedenen Störungen der Hormonsynthese in der Nebennierenrinde, befassten sich anfangs vorwiegend mit dem *CYP11B1-Gen*. Während der Klonierung dieses Gens wurde durch Zufall das *CYP11B2-Gen*, welches die Aldosteronsynthese kodiert, entdeckt. Es schien jedoch nicht in den Nebennierenrindenzellen exprimiert zu werden, da dort keine mRNA zu finden war [12]. 1990 wurde dann eine Transkription in Aldosteron produzierenden Tumorzellen von Kawamoto et al. nachgewiesen [13]. In Expressionsstudien in COS-7 Zellen wurde die Funktion der Aldosteronsynthese bewiesen.

Bei der 11β -Hydroxylase und der Aldosteronsynthese handelt es sich um Isoenzyme, die von oben genannten Genen kodiert werden. Beide liegen auf dem langen Arm des Chromosoms 8 nur ca. 40 kb voneinander entfernt. Das *CYP11B1-* und *CYP11B2-Gen* sind zu 93 % in ihrer Nukleotidsequenz homolog [14]. Das heißt bei einer Länge von 503 Aminosäuren, dass lediglich 32 Aminosäuren verschieden sind [15]. 95% der neun Exons stimmen überein [12].

Bei beiden Enzymen handelt es sich um Monooxygenasen die der Familie der Cytochrom P450-Enzyme zugeordnet werden können. Die Enzyme enthalten im katalytischen Zentrum als prosthetische Gruppe ein Häm-System, dessen dreiwertiges Eisen während der Reaktion reduziert wird. Als Besonderheit zu anderen Häm-Enzymen enthalten die Cytochrom P450 Enzyme ein Cysteinat als fünften Liganden am Porphyrinsystem. Dieser Aufbau ist für ein Absorptionsmaximum nach Reaktion mit Kohlenmonoxid bei 450 nm verantwortlich und hat der Enzymgruppe ihren Namen gegeben.

Als Coenzyme der Aldosteronsynthese dienen die Flavoproteine Adrenodoxin Reduktase (AR) und Adrenodoxin (Adx). Diese dienen als Elektronentransportkette zur Aktivierung des Sauerstoffs, der zur Hydroxylierung der Steroidhormone benötigt wird. Als Elektronenquelle dient das NADPH [5].

1.5 Mutationen im *CYP11B2* Gen

Mutationen im *CYP11B2-Gen* können je nach Lokalisation verschiedenen Einfluß auf die Aktivität der Aldosteronsynthese haben. Eine Übersicht der bisher publizierten Mutationen zeigt Tabelle 3 im Anhang.

Je nach der Art und Position der Mutation im *CYP11B2-Gen* resultieren unterschiedlich ausgeprägte Störungen der Enzymaktivität. Käme es zu einem kompletten Verlust der 11 β -Hydroxylase- und 18-Hydroxylaseaktivität würde sich der ASM Typ I erklären [10]. Andere Mutationen ließen die 18-Hydroxylaseaktivität unbeeinträchtigt und würden lediglich die 18-Oxidation stören. Hieraus würde sich der ASM Typ II erklären [16].

Die Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp wurde in vielen Studien als problematisch beschrieben. Mutationen die vom Bild der klinischen Befunde und des Steroidprofils einen ASM Typ I entsprachen, zeigen bei in vitro Versuchen noch Restaktivitäten des Enzyms. Das würde auf einen ASM Typ II schließen lassen [17].

Auch wurden Patienten beschrieben, bei denen trotz klinischer Auffälligkeiten keine Mutation nachgewiesen werden konnten [18].

Das zeigt, dass es noch nicht ausreichend gelungen ist molekularbiologisch einen Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp zu finden, der diese Formen zufrieden stellend erklärt.

Im *CYP11B2-Gen* wurden diverse Polymorphismen identifiziert. Ein Beispiel ist der Polymorphismus K173R [19]. Hier ist die Aminosäure Lysin gegen Arginin getauscht. Zwar wurde dieser Polymorphismus vorwiegend bei symptomatischen chilenischen Hochdruck Patienten gefunden, die einen erniedrigten Reninspiegel aufwiesen. In in-vitro-Studien stellten die Wissenschaftler jedoch keine Beeinträchtigung der Genexpression, sondern eine äquivalente Aldosteronsyntheseaktivität fest.

2 Fragestellung und Zielsetzung

In dieser Arbeit wurde von 8 Patienten, die klinisch das Bild eines Aldosteronsynthesemangels zeigten, das *CYP11B2-Gen* untersucht.

Es sollte geklärt werden, ob sich bei klinischem Verdacht Mutationen im *CYP11B2-Gen* finden lassen, und in wie weit diese Mutationen Einfluss auf die Aktivität der Aldosteronsynthase haben.

Können bei den Patienten neue Polymorphismen detektiert werden und welche Prävalenz haben diese in der zugrunde liegenden Bevölkerung?

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Die zu untersuchenden Mutationen wurden aus den Analysen der Einsendungen des Labors für Pädiatrische Endokrinologie der Kinderklinik des UK-SH, Campus Kiel rekrutiert. Patienten bzw. Eltern gaben ihr Einverständnis in die Analytik. Ein Ethikvotum der hiesigen Ethikkommission liegt vor.

Alle Patienten hatten ein normales Geburtsgewicht, welches zwischen 2270 und 3990 g lag.

Bei der Diagnosestellung fielen alle Kinder durch Gedeihstörung trotz teilweise gutem Trinkverhalten, wiederholtem Erbrechen und Durchfällen auf. Des Weiteren wiesen die Patienten eine Hyponatriämie mit Werten zwischen 114 mmol/l und 128 mmol/l, eine Hyperkaliämie mit 6 mmol/l bis 8,3 mmol/l und eine erhöhte Plasma-Renin-Aktivität auf. Bei zwei Patienten lagen keine Angaben zur Plasma-Renin-Aktivität vor. Die folgenden Multisteroidanalysen brachten Aufschluss über den Hormonstatus. Bei allen Patienten waren die Aldosteronwerte vermindert (siehe Tabelle 4 im Anhang).

Unter einer Therapie mit Fludrokortison und NaCl-Kapseln besserte sich die Symptomatik.

Die Patienten stammten aus Italien, Deutschland, Niederlande, Ungarn, Türkei und Israel.

Die Mutationen der Patienten wurden mittels direkter Sequenzierung im molekulargenetischen Routinelabor ermittelt. Bei der Untersuchung wurde meist die Familie mit untersucht, um den Erbmodus nachzuvollziehen. Die Mutationen G435S, V386A und R181W wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht, da sie bereits in anderen Arbeiten näher betrachtet wurden [13, 17, 20].

Für die Untersuchung des Polymorphismus I339T wurden 52 Patienten aus dem Nahen Osten untersucht. Davon kamen 23 aus Ägypten. Die weiteren Patienten kamen aus dem Iran, Israel und der Türkei. Es wurde sichergestellt, dass die Patienten aus unterschiedlichen Familien kamen, so dass eine familiäre Häufung des Auftretens der Polymorphismen weitestgehend ausgeschlossen werden konnte. Um einen möglichen Unterschied zwischen den Herkunftsregionen herauszufinden wurden zum Vergleich 59 Patienten aus Nordeuropa untersucht. Das Material stammte aus dem Patientengut der Kinderklinik. Das Einverständnis der Probanden für diese Untersuchungen lag vor.

3.2 Molekularbiologische Methoden

Die *CYP11B2* Wildtyp-cDNA erhielten wir von Prof. Rainey, University of Texas, Dallas, USA. Sie wurde in die Multiklonierungsstelle des eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* hineinkloniert. Der pcDNA3-Vector ist ein 5,4 kb langes Plasmid, dessen Expression konstitutiv über einen Cytomegalievirus (CMV-) Promoter reguliert wird und des Weiteren ein Resistenzgen für Ampicillin trägt. Dieses Konstrukt war die Vorlage für alle weiteren Schritte der Mutagenese. Die Mutationen wurden nach dem Prinzip der *site-directed* mutagenesis (Mutagenese) mit Hilfe von Oligonukleotid-Primern in die Vektoren eingefügt.

3.2.1 Mutagenese

Zur Durchführung der Mutagenese wurde der QuickChange XL site-directed Mutagenese-Kit (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verwendet.

Die Oligonukleotid-Primer (Siehe Tabelle 6 im Anhang) für die entsprechenden Mutationen wurden von den Firmen Metabion (Martinsried, Deutschland) und Eurogentec (Köln, Deutschland) bezogen. Unter Verwendung des o.g. Mutagenese Kit mit der Pfu-Turbo DNA Polymerase wurden die Mutationen in die pcDNA3 eingebracht. Das Protokoll des Herstellers wurde befolgt.

Um die nicht mutierte DNA nach der Amplifikation zu entfernen wurden die Ansätze mit 1,2 µl des Restriktionsenzym *DpnI* (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) versetzt. Dieses verdaut das methylierte nicht-mutierte „Mutterplasmid“ welches die WT-cDNA enthält.

In einem weiteren Schritt folgte die Transformation der Mutageneseprodukte in XL10-Gold[®] Ultracompetent Zellen (Stratagene, Amsterdam, Niederlande).

Dazu wurden 50 µl kompetente Zellen mit 1 µl β-Mercaptanol in ein auf Eis gelagertes Falcon-Röhrchen gegeben. Während der nächsten 10 min wurde das Gemisch auf Eis inkubiert und alle 2 min vorsichtig gemischt. Danach wurden 2,5 µl des Mutageneseproduktes hinzu pipetiert. Für die nächsten 30 min wurden die Falcon-Röhrchen auf Eis inkubiert, für 40 Sekunden in ein 42 °C warmes Wasserbad getaucht und weitere 2 min auf Eis inkubiert.

Während der 30 min wurde ein Ansatz aus 35 µl Broth/ml NZY bei 42 °C warmgestellt. Davon wurden jeweils 450 µl auf den Ansatz aus kompetenten Zellen und dem Mutageneseprodukt pipetiert.

Danach wurden die Proben bei 37 °C und 250 rpm für eine Stunde inkubiert.

Um einzelne Kolonien mit jeweils nur einem Klon zu gewinnen, wurden jeweils 250 µl des Ansatzes auf eine mit Ampicillin versetzte Agarplatte ausplattiert.

Die Kolonien wurden bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden ca. 10 Kolonien pro Platte gepickt. Diese wurden zur weiteren Verarbeitung in 10 µl ddH₂O gelöst.

Die gepickten Klone wurden in einer Über-Nacht-Kultur, bestehend aus 6 ml LB-Medium und 25 mg/ml Ampicillin, bei 37 °C und 300-350 RPM kultiviert.

Zur Plasmidaufreinigung wurde der "NucleoSpin[®] Plasmid QuickPure"-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers verwendet.

Nach Gewinnung der dsDNA wurde deren Konzentration gemessen. Dazu wurden 5 µl des Eluats mit 395 µl Aqua bidest versetzt und dieses Gemisch in einem Eppendorf Photometer (Hamburg, Deutschland) bei 260 nm gemessen.

3.2.2 Sequenzierung

Die hier durchgeführte Methode zur Sequenzierung basiert auf einem modifizierten Verfahren der Sanger-Methode. Die aufgereinigte DNA wurde direkt, ohne weitere Subklonierung in einen anderen Vektor mittels des Taq Cycle-Sequenzierung, sequenziert.

Der Primer diente als Startermolekül für die Synthese des komplementären Stranges, welche durch die Taq-Polymerase durchgeführt wird. Die Verlängerung fand in 5' => 3' Richtung statt.

Dem Reaktionsansatz wurden neben den „normalen“ Desoxyribonucleosid-Triphosphate noch 2',3'-Dideoxynucleotidtriphosphate (ddNTP) hinzugegeben. Anstatt der OH-Gruppe befindet sich am 3'-Ende der DNA Vorlage ein Fluoreszenzmarker. Da so keine weitere 3'-Hydroxygruppe mehr vorhanden ist, an die die nächste Base binden könnte, führt der Einbau dieser ddNTPs zum Kettenabbruch. Es entstehen DNA-Fragmente, die am 3'-Ende mit verschiedenen farbigen Fluoreszenzmarker für Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin markiert sind. Diese werden später mit Hilfe eines Lasers detektiert.

Es wurde eine Primer-Verdünnung hergestellt, in der jeweils 10 pmol/µl des Sequenzierprimers enthalten sind. 2,8 µl der Primer-Verdünnung wurden mit 3 µl Cycle Sequencing Ready Mix, 1 µg Template und 4 µl des 1x Puffers gemischt.

Dem Ansatz wurden 9 µl Chill-Out Liquid Wax zugesetzt. Im Thermocycler folgten 37 Zyklen die sich in 2 min Denaturierung bei 95 °C, 30 Sekunden Annealing sowie die DNA-Polymerisation unterteilen. Die Annealing-Temperaturen der einzelnen Primern können der Tabelle 7 im Anhang entnommen werden.

Um die Proben mittels Elektrophorese analysieren zu können, wurde das gesamte Volumen des Reaktionsansatzes in MicroSpin Columns übertragen, welche 1 min bei 5000 RPM zentrifugiert wurden. Zur Denaturierung bei 95 °C für 2 min wurden 12 µl des Template mit 17 µl Formamide versetzt. Die Elektrophorese wurde auf einem ABI 310 Kapillarsequenzierer (AppliedBiosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt und die Analyse der Sequenzierung erfolgte mit der SeqScape Version 1.0 (AppliedBiosystems) Software.

3.2.3 Subklonierung in den pcDNA3-Vektor

Um Mutationen im Expressionsvektor pcDNA3 auszuschließen, die während der Mutagenese entstanden seien könnten, wurden die mutagenisierte *CYP11B2-cDNA* in einen linearisierten pcDNA3-Vektor umklontiert. Nach dem Nachweis der gewünschten Mutation im Cycle Sequencing, wurde der Expressionsvektor aus der Plasmid-DNA herausgeschnitten und zur weiteren Verarbeitung aufgereinigt. Es wurden Ansätze aus 1 µg Template, 2 µl PufferH, 2 µl 1:10 verdünntem BSA und 1 µl des Restriktionsenzym (*EcoRI*) erstellt. Das Volumen wurde mit A. Bidest auf 20 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden mit 9 µl Chill-Out Liquid WAX versehen, in einen PCR-Cycler (Biotron, Göttingen, Deutschland) gestellt und über Nacht verdaut.

Um den Vektor gesondert weiter verarbeiten zu können, wurde der Restriktionsverdau zentrifugiert und gekühlt. Die Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Standard wurde 1 KB Plus verwendet. Die gewünschten Banden, mit einer Länge von 1,65 kB wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und ausgestanzt. Die Proben wurden mit dem EasyPure Kit (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Zur Religation des Restriktionsproduktes in einen linearisierten, dephosphorylierten Vektor - in diesem Fall diente hierzu die mit *ECO RI* geschnittene pcDNA 3 - wurden zwei Ansätze pipettiert, in denen das Ligationsprodukt in zwei- bis dreifachem Überschuß vorlag. Pro Ansatz wurde 1 µl 10 x Ligasepuffer, 1 µl rATP (Stratgene, La Jolla, USA) und 1 µl T₄-

Ligase (4 U/ μ l) hinzu pipettiert. Der Ansatz wurde mit A. bidest auf ein Volumen von 10 μ l aufgefüllt. Die Ligationsreaktion fand für 5 min bei 45 °C und für die nächsten 14 Stunden bei 14 °C statt.

Folgend wurden Glycerolkulturen hergestellt, indem 400 μ l der Zellkultur in 100 μ l eines 50%igen Glycerol/ H₂O-Gemisches vermennt und bei -80 ° C gelagert wurden. Hieraus konnten nach erfolgreicher Sequenzierung die pcDNA-Insert Konstrukte in größeren Mengen unter Verwendung des Endo Free Plasmid Maxi Kits (Quiagen, Hilden, Deutschland.) für die Transfektion hergestellt werden.

3.3 *In vitro* Expressionsanalyse im eukaryontischen Expressionssystem

3.3.1 Transiente Transfektion von COS 7-Zellen

Zur Transfektion wurden COS7-Zellen genutzt. Es handelt sich dabei um eine fibroblasten ähnliche Zelllinie aus der Niere der Grünen Meerkatze. Um eine ausreichende Anzahl und Dichte der COS7-Zellen für die folgenden Experimente zu erhalten, wurden jeweils 500000 Zellen pro Six well ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 4,7 % CO₂ bis zur Konfluenz kultiviert. Als Nährmedium wurden 500 ml Dubecco's MEM (Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 50 ml fetalem Kälberserum (FCS) 10 % (Biochrom, Berlin, Deutschland), 5 ml Penicillin / Streptomycin 100 U/ml (Sigma, Hamburg, Germany) und 200 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland) angesetzt und verwendet.

Am folgenden Tag wurden die Zellen mit den Expressionsvektoren, die die zu untersuchenden Mutationen aufwiesen, transient transfektiert. Hierzu wurde das Medium Dulbecco's MEM mit 200 mM L-Glutamin ohne Kälberserum und ohne Penicillin / Streptomycin (Transfektionsmedium) verwendet. Zu 375 μ l dieses Transfektionsmediums wurden 6 μ l Lipofektamin hinzugegeben (Stock B). Das Lipofektamin dient der Einbringung der Fremd-DNA in die Zellen. Stock A wurde mit 375 μ l Transfektionsmedium, 1 μ l β -Galactosidase, 0,5 μ g Adx und 0,5 μ g AR angesetzt. Adx und AR wurden in das pECE-Plasmid (freundlicherweise bereit gestellt von Dr. W. L. Miller, Department of Pediatrics, University of California, San Francisco, San Francisco, CA), die β -Galaktosidase in den pSV-Vektor (Promega, Mannheim, Germany) kloniert. Hier wurde außerdem 1 μ g des Plasmids, welches die gewünschte Mutation enthielt hinzugefügt.

Nun wurden 375 μ l Stock B zu Stock A hinzugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurden weitere 750 μ l des Transfektionsmediums hinzugefügt. Die

Ansätze wurden auf die Zellen pipettiert und für 5 Stunden bei 37 °C und 4,7 % CO₂ inkubiert. Dann wurde das Transfektionsmedium von den Zellen abgezogen und diese über Nacht (für 24 - 72 Stunden) in 2 ml des Nährmediums erneut kultiviert.

3.3.2 Hormoninkubation und Dünnschichtchromatographie

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in 1 ml Nährmedium mit 0,2 µCi/ml Tritium-markiertem 11-Desoxycorticosteron ([³H]-DOC) als radioaktiver Marker und 2 µmol/l nichtradioaktivem DOC für 18 h inkubiert. Tritium ist ein natürliches Isotop des Wasserstoffs. Durch die Hinzugabe des radioaktiv markierten DOCs kann indirekt auf die gesamte Syntheseleistung der Zellen geschlossen werden.

Zur Extraktion der Steroide wurde das Medium in 20 ml-Glasspitzröhrchen pipettiert und mit 10 ml eiskaltem Dichlormethan versetzt. Nun wurde jedes Gemisch 6 Minuten lang geschüttelt, um die Steroide in das Dichlormethan zu überführen. Dies wurde unter Stickstoff abgedampft. Die Steroide wurden in 25 µl Ethanol in Lösung gebracht und auf Kieselgel-Dünnschichtchromatographieplatten aufgetragen.

Die aufgetragenen Proben wurden ca. 1 h in ein Laufmittel aus Dichlormethan, Methanol und Aqua bidest im Verhältnis 300 : 20 : 1 gestellt. Dadurch trennten sich die verschiedenen Stoffwechselprodukte (DOC, B, Aldosteron, 18-OHB) auf und wurden getrennt messbar. Als Standard diente ein Gemisch aus je 25 µM DOC, B, Aldosteron und 18-OHB.

Die vorhandene Radioaktivität der einzelnen Bahnen wurde mit dem Rita-Detektor (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) in Counts per minute ausgezählt und am Computer mit Hilfe des Steuerungsprogramms Rita Controll (Version 1.24, raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland) überprüft und mit dem Computerprogramm Rita TLC Analysis (Version 1.97, Raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland) ausgewertet.

3.3.3 Statistische Auswertung

Aus den Rohdaten wurden die Hormonkonzentrationen der Zwischenprodukte, sowie des Aldosterons in µmol/l umgerechnet und in Zusammenhang mit der Proteinkonzentration gesetzt. Um die Daten besser vergleichen zu können wurden sie in Vergleich zum Wildtypen gesetzt und in Prozent umgerechnet.

3.4 Proteinanalyse

3.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Um die Proteine der transfizierten COS-7 Zellen quantitativ bestimmen zu können wurden diese nach Protokoll geerntet (vgl. Tabelle 8 im Anhang) und lysiert.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 5 µl der Extrakte mit 345 µl ddH₂O verdünnt und 500 µl des Indikators Coomassie-Brilliant Blau (Pierce, Rockford, USA) hinzugegeben. Die Extinktion der gebildeten Komplexe mit den Proteinen wurde in einem Photometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 595 nm gemessen.

3.4.2 Western-Blot

Zum spezifischen Nachweis der Translation der mutierten Enzyme diente der Western-Blot.

Die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Gelelektrophorese erfolgte mit einem NOVEX Pre-Cast Gel (Polyacrylamid) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

Es wurden pro Probe 4 µg Protein vorbereitet. Zu diesem Ansatz wurden 2,5 µl LDS Sample Buffer (4 x) und 1,0 µl Reducing Agent (10 x) hinzugegeben und auf ein Gesamtvolumen von 10 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben für 10 min bei 70 °C inkubiert und zum Stoppen der Reaktion auf Eis gestellt.

Währenddessen wurde der MOPS-Puffer (1 x SDS Laufpuffer) angesetzt, von welchem 200 ml abgenommen und mit 500 µl Antioxidant versetzt wurden. Dieser Puffer wurde in die innere Kammer gefüllt. Die äußere wurde mit dem restlichen MOPS-Puffer gefüllt .

Als Längenstandard wurden 5 µl MagicMark Western Protein Standard (20-120 kDa) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

Zum Transfer der Proteine vom Gel auf eine Cellulosenitrat-Membran (Protran BA 85) (Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland) wurde das XcellTM Blot Module (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) genutzt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Hilfe eines Filterpapiers in das Blot Modul transferiert.

Die äußere Kammer wird mit 600 ml Aqua bidest, die Innere mit 200 ml Transferpuffer (vgl. Tabelle im Anhang) gefüllt, der Transfer wurde bei 30 V für 1 Stunde durchgeführt.

Zur ersten Färbung der Membranen, die als Kontrolle diente, wurden diese für 15 min in Ponceau S concentrate Sigma Diagnostics (6 x 20 ml, Verdünnung 1:10) inkubiert und danach

mit H₂O gewaschen. Über Nacht inkubierten die Membranen bei 4 °C im Blocking Puffer 1 (5 % Milchpulver + 0,1 % Tween20 + 1 x TBS).

Die immunologische Darstellung der Proteine erfolgte mit zwei verschiedenen Antikörpern. Der primäre Antikörper (Anithuman CYP11 β , freundlicherweise bereitgestellt von Dr. H. Takemori (Department of Molecular Physiological Chemistry, Osaka University Medical School, Osaka, Japan)) wurde im Blocking Puffer1 1:10000 verdünnt. Die Membranen wurden für eine Stunde inkubiert. Danach wurden sie mit 1x TBS, welches mit 0,1 % Tween20 versetzt wurde dreimal 15 min gewaschen.

Der sekundäre Antikörper (Anti Rabbit IgG (Fc) AP conjugate 1 μ g/ μ l) wurde 1:7500 im Blocking Puffer 2 (10 % Milchpulver+0,1 % Tween20+1x TBS) verdünnt. Auch hier betrug die Inkubationszeit eine Stunde. Erneut wurden die Membranen mit 1x TBS, welches ebenfalls mit 0,1 % Tween20 versetzt wurde dreimal für 15 min gewaschen. Um die Banden auf dem Röntgenfilm darstellen zu können, wurden die Membranen erst 10 min in Detektionspuffer und danach für 5 min mit CDP-Star (1:100) inkubiert. Nun folgte die Exposition auf Hyperfilm MP (amersham pharmacia biotech) für 90 min.

3.5 Immunfluoreszenz

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation der mutierten Aldosteronsynthase wurde die Immunfluoreszenz durchgeführt. 500 000 COS7 Zellen wurden in Six-wells auf Deckgläschen bis zur Konfluenz wachsen gelassen und mit CYP11B2-cDNA des Wildtyps und der Mutanten transient transfiziert (s. Kap. 1.1.1 und 1.1.2). Nach Konfluenz am dritten Tag konnte die Immunfluoreszenz durchgeführt werden. Die Zellen wurde mit 2 ml 3 % Formalin/1x PBS fixiert. Es folge eine Inkubation für 20 min, danach wurde die Formalinlösung dekantiert. Zur Permeabilisierung der Zellen folgte eine Inkubation für 5 min in 2 ml 1 % TritonX-100/1x PBS- Lösung.

Für die nächsten 60 Minuten inkubierten die Zellen im primären Antikörpergemisch, welches je eine 1:200 Verdünnung des Anithuman CYP11B rabbit-Antiserum, der auch im Western Blot verwendet wurde, und des Maus Anti-GRP 75-Antikörpers (BIOMOL, Hamburg, Deutschland) enthielt. Das Antikörpergemisch der sekundären Antikörper bestand zum einen aus einer 1:500 Verdünnung des Antirabbit-ALEXA 594 Antikörper (Molecular Probes, Leiden, Niederlande), zum anderen aus einer 1:50 Verdünnung des Antimouse Fluoreszein isothiocyanat Antikörper (Dianova, Hamburg, Germany) . Die Inkubation fand erneut 60 min

statt. Zur Markierung der DNA wurde 5 µl Konservierungslösung bestehend aus 10 mg p-Phenylendiamin, 1 ml Tris (1 M, pH 8,5) und 9 ml Glycerin aufgetragen. Unter dem Immunfluoreszenzmikroskop konnte die Färbung sichtbar gemacht werden.

3.6 Alignments der Proteinsequenz der Aldosteronsynthase

Um zu prüfen, ob die einzelnen Mutationen an ihren Positionen konserviert sind, wurden Alignments zwischen den Aminosäuresequenzen vom Menschen, Hamster, Goldhamster, Hausmaus, Hausmeerschweinchen und der Wanderratte angefertigt. Die Sequenzen wurden aus der Datenbank des European Bioinformatics Instituts bezogen. Mit Hilfe des ClustalW2-Programms wurden die Sequenzen vergleichend untereinander gestellt und mögliche Abweichungen im Bereich der Mutationen detektiert.

3.7 Analyse der Allelfrequenz

Zur weiteren Quantifizierung der Polymorphismen in der Bevölkerung wurde eine Analyse der Allelfrequenz durchgeführt. Zunächst wurde die Stelle der DNA, die den gewünschten SNP (single nucleotide polymorphism) trägt mittels PCR amplifiziert. Der Polymorphismus I339T war im Exon 6 zu finden, so dass bei jedem Patienten Exon 5 bis 9 amplifiziert wurden.

Die PCR erfolgte mit einer rekombinanten DNA-Polymerase von *Thermus thermophilus* (rTth-Polymerase). Der Primer (siehe Tabelle 10 im Anhang) wurde auf 20 pmol/µl verdünnt. Zu 4,6 µl der Primer-Mix wurden 11 µl ddH₂O, 12 µl XXL-Puffer, 8 µl dNTP-Mix und 4,4 µl MgO(AC)² pipetiert.

Der Ansatz wurde mit 9 µl Chill-Out Liquid WAX versehen und so vom Upper-Mix getrennt. Dieser wurde aus 18 µl XXL-Puffer, 2 µl rTth-Polymerase und 1 µg Template hergestellt.

Die Denaturierung fand für 4 min bei 94 °C statt. Danach folgten 33 Zyklen bestehend aus 1 min Denaturierung bei 94 °C, 1 min Amplifikation bei 66 °C und 6 min Elongation bei 72 °C.

Im letzten Zyklus dauerte die Elongation 15 min. Danach wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gekühlt. Es wurde eine Gelelektrophorese als PCR-Kontrolle durchgeführt. Die Banden des amplifizierten Gens sollten bei 2900 Basenpaaren zu sehen sein.

Nun wurde das PCR-Produkt mit Hilfe des QIAquick[®] PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) von überschüssigen Reaktionsbestandteilen befreit, die die folgenden

Reaktionen stören könnten. Die Aufreinigung folgte den Herstellerangaben.

Für die SNaPSHots wurde der SNaPSHots™ Multiplex Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Primer wurden von der Firma Metabion bezogen und so ausgewählt, dass sie direkt eine Base vor dem gewünschten Polymorphismus an das amplifizierte Fragment bindeten. Sie wurden auf 10 pmol/µl verdünnt.

Im Pre-Mix des Kits waren eine AmpliTaq® DNA Polymerase, fluoreszenzmarkierte Abbruchnukleotide (ddNTPs) und der Multiplex Reaction Buffer enthalten. Diese markieren Adenosin mit einem grünen, Guanin mit einem blauen, Cytosin mit einem schwarzen und Thymin mit einem roten Farbstoff. Als Produkt der Sequenzierung erhielt man so den spezifischen Primer mit einem an die Stelle des Polymorphismus eingebauten fluoreszenzmarkierten Abbruchnukleotid.

Es wurden Reaktionsansätze aus 1 µl Primerverdünnung, 1,5 µl Pre-Mix und 2 µl Template erstellt.

Um Interferenzen der überflüssigen ddNTPs mit den wichtigen Fragmenten zu vermeiden, wurden 1,5 µl der Shrimp Alkaline Phosphatase hinzugegeben und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach folgten noch 15 Minuten bei 72 °C und bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben auf 4 °C herunter gekühlt.

Um die Proben später im Sequenzierer auswerten zu können wurden je 1,5 µl des Templates mit 17 µl Formamid und 0,5 µl LIZ-Standardt versetzt.

3.8 Statistische Auswertung

Die Enzymaktivitäten aller Mutanten wurden nach initialem Test auf Normalverteilung im T-Test untereinander auf signifikante Unterschiede Aldosteronsynthese Wildtyps geprüft. Dabei wurde $p < 0.05$ als signifikanter Unterschied definiert.

Die Unterschiede der Häufigkeitsverteilung des Polymorphismus I339T in der Europäischen Kohorte und dem Kollektiv aus dem Nahen Osten wurden mit einem χ^2 -Test berechnet. Dabei wurde $p < 0.05$ als signifikanter Unterschied definiert.

Die Berechnungen wurden mit dem Programm SigmaStat für Windows (Systat Software, Erkrath) berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Mutationsanalyse

Die Sequenzierung des *CYP 11B2* Gens des Patienten 1 zeigte zwei heterozygote Punktmutationen, bei der es im Exon 5 zu einem Basenaustausch von Guanin (G) gegen Adenin (A) an Position 941 kam (c.941G>A). Dies hat einen Aminosäureaustausch von Glycin zu Arginin zur Folge (p.**G314R**). Des Weiteren wurde im Exon 1 die Sequenz der Basen in Position 189 geändert. Hier kam es zu einem Aminosäuretausch von Histidin zu Asparaginsäure (p.H63D). Die Mutter war heterozygot für diese Mutationen, das Erbgut des Vaters wies keine Mutation auf.

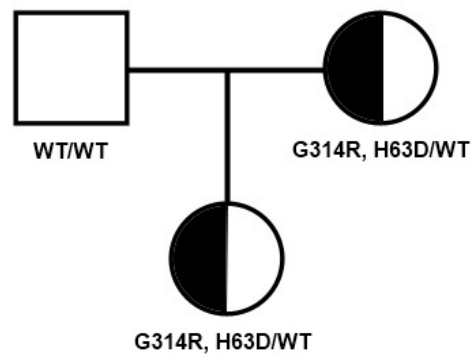


Abbildung 4: Stammbaum des Patienten 1; Erklärung s. Text

Bei Patient 2 konnten insgesamt drei Mutationen in Exon 2, 7 und 8 gefunden werden, für die der Patient jeweils heterozygot war. Bei der Mutation im Exon 2 an Position 349 entstand durch den Austausch der Base Guanin (G) gegen Thymin (T) ein verändertes Triplet (c.349G>T), welches Cystein anstelle Tryptophan codierte (p.**W116C**). Die Mutation im Exon 7, bei der Guanin (G) gegen Cytosin (C) (c.1155G>C) getauscht wurde, hatte eine Codierung von Alanin anstatt Valin zur Folge (p.V386A). Die Sequenzvariation im Exon 8 an Position 1304 hatte eine Änderung der Basenkonstellation vom WT (GGC) zu AGC zur Folge (c.1304G>A). Dadurch wird an Position 435 nicht mehr die AS Glycin, sondern Serin codiert (G435S). Alle Mutationen fanden sich auf dem Allel des Vaters.

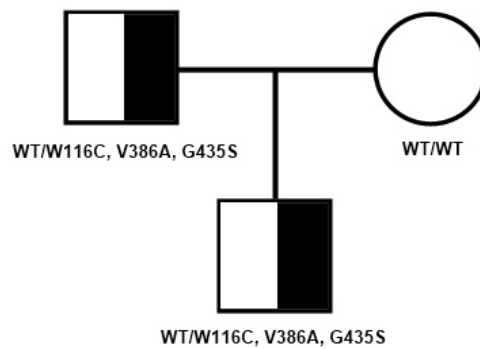


Abbildung 5: Stammbaum des Patienten 3; Erklärung s. Text

Beim Patienten 3 wurden zwei heterozygote Veränderungen der Basensequenz in Exon 4 entdeckt. Es kam an Position 207 zu einem Basenaustausch von Adenin gegen Cytosin (c.207A>C), welches zu einem Aminosäuretausch von Histidin zu Prolin führte (p.**H69P**). An Position 339 fand sich ein homozygoter Basenaustausch von Thyrosin (T) zu Cytosin (C) (c.1017T>C). Die Wildtypsequenz codiert an dieser Stelle die Aminosäure Isoleucin. Durch die mutierte Basenkonstellation findet sich an dieser Stelle nun die Aminosäure Threonin (p.**I339T**). Eltern standen zur Untersuchung nicht zur Verfügung.

Bei Patient 4 wurde im Exon 7 ein Basenaustausch von Thyrosin (T) zu Adenin (A) an Position 1191 identifiziert (c.1192T>A), der im Codon 397 zu einem Tausch der Aminosäure Isoleucin zu Asparagin führte (p.**I397N**). Der Patient war für diese Mutation homozygot. Die Eltern standen zur Untersuchung nicht zur Verfügung. Über den Vererbungsmodus lagen bei den Patienten 3 und 4 keine weiteren Informationen vor.

Die homozygote Punktmutation in Codon 451 des Patienten 5 bewirkte einen Basenaustausch an Position 1353 von Cytosin (C) gegen Thyrosin (T) (c.1352C>T), was eine Änderung der Aminosäure von Leucin zu Phenylalanin verursacht (p.**L451F**). Beide Eltern waren für diese Mutation heterozygot, der Patient homozygot.

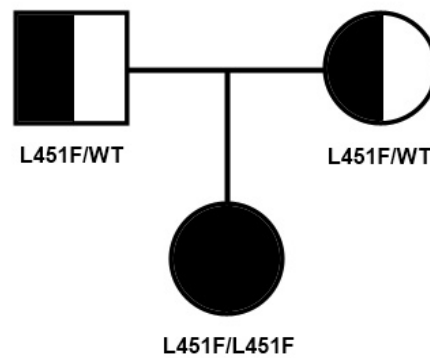


Abbildung 6: Stammbaum des Patienten 6; Erklärung s. Text

Der Patient 6 war homozygot für eine Mutation, die sich in Exon 7 befand. Hier wurde in Position 1132 die Base Cytosin (C) gegen Guanin (G) getauscht (c.1132C>G), was zu einer Änderung von Prolin zu Arginin führte (p.**P377R**).

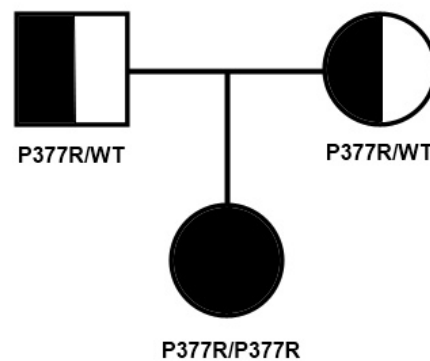


Abbildung 7: Stammbaum des Patienten 7; Erklärung s. Text

Bei Patient 7 wurden zwei Mutationen in Exon 3 gefunden. Die eine Mutation (c.543C>T) führt zur Änderung der Aminosäureposition 181 (p.R181W), wo Arginin gegen Tryptophan ersetzt wird. Diese Mutation konnte weder beim Vater noch bei der Mutter detektiert werden, so dass es sich um eine Neumutation handeln muss. Eine weitere Mutation zeigte einen Basenaustausch an Position 423, wo Guanin (G) gegen Adenin (A) getauscht wurde (c.423G>A) und so Arginin gegen Glutamin ersetzt wurde (p.**R141Q**). Die Mutation wurde heterozygot durch das paternale Allel vererbt. Unbestätigt bleibt, ob beide Mutationen auf einem oder zwei Allelen liegen.

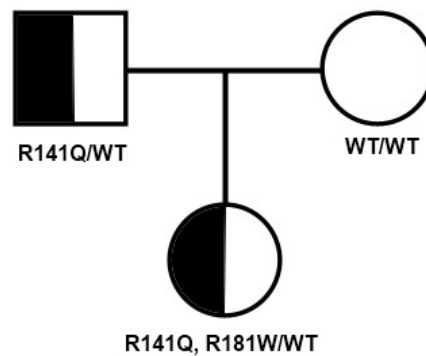


Abbildung 8: Stammbaum des Patienten 8; Erklärung s. Text

Patient 8 wies ebenfalls zwei heterozygote Mutationen in Exon 8 und 9 auf. Der Aminosäureaustausch p.**R412P** (Arginin gegen Prolin) begründet sich in eine Basentausch von Guanin (G) gegen Cytosin (C) in Codon 412 (c.1236G>C) in Exon 8. In Exon 9 fand sich eine Leserasterverschiebung durch die Insertion der Base Tyrosin (T) zwischen bp-Positionen 1487 und 1488 (1487**insT**). Der Vererbungsmodus ist nicht bekannt.

Eine Übersicht aller Mutationen zeigt die Tabelle 11 im Anhang.

4.2 Western Blot

Der Western Blot diente dem Nachweis der Translation der Aldosteronsynthese in transfizierten COS 7-Zellen.

Die Western Blot Analyse zeigte eine vergleichbar effiziente Translation in den COS 7-Zellen sowohl der mit dem Wildtyp als auch der mit den CYP11B2 Mutationen transient transfizierten COS 7-Zellen. Bei 48,5 kDa zeigte sich die Bande der Aldosteronsynthese. Die etwas schwächere Bande bei 50 kDa entsprach ihrem Vorläuferprotein. Bei ca. 60 kDa findet sich eine einzelne unspezifische Bande. Wenn diese auf jeder Spur gleich ausgeprägt ist, spricht sie dafür, dass überall ungefähr gleich viel Protein aufgetragen wurde.

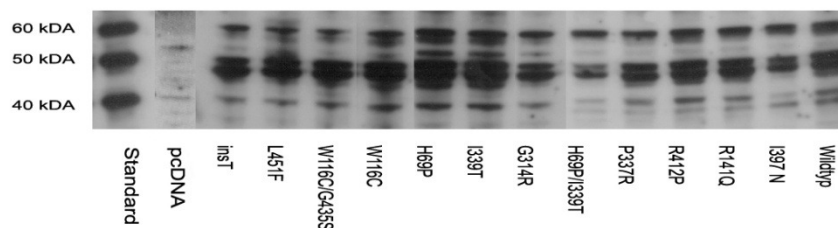


Abbildung 9: Western Blot

Bei den Mutationen I397N, G314R und der Doppelmutante H69P/I339T zeigte sich ein Verlust der Bandenintensität im Vergleich zum Wildtyp. Andere Mutationen, wie z.B. die H69P, W116C oder L451F zeigten hingegen eine höhere Intensität der spezifischen Bande.

4.3 Immunfluoreszenzen

In der Immunfluoreszenz zeigte sich die korrekte intrazelluläre Lokalisation sowohl des Wildtypes als auch der Mutanten. Die Aldosteronsynthese ist bei allen Mutationen in der mitochondrialen Membran der transfizierten COS 7-Zellen zu finden. Die rote Fluoreszenz stellt die Lokalisation der CYP11B2 dar, mit der grünen Fluoreszenz wurden die Mitochondrien markiert. Die Gelbfärbung entstand bei Überlagerung beider Bilder und zeigte so die mitochondriale Lage der Aldosteronsynthese. Hier werden nur einige Mutanten exemplarisch gezeigt, da die Ergebnisse sich nicht voneinander unterscheiden.

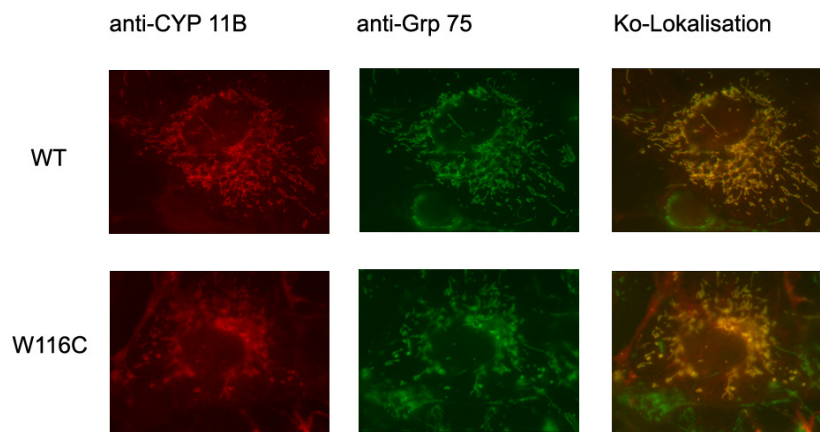


Abbildung 10: Immunfluoreszenzbilder; linke Bildreihe Lokalisation der CYP11B2; mittlere Bildreihe Lokalisation der Mitochondrien; rechte Bildreihe mitochondriale Lokalisation der CYP11B2.

4.4 Expressionsanalyse und Aktivitätsmessung

Nachdem sich die Proteintranslation im Western-Blot bestätigt hatte, erfolgte die Inkubation der COS 7-Zelle mit radioaktivmarkiertem DOC, um die Aktivität der exprimierten Aldosteronsynthase zu messen. Mittels Dünnschichtchromatographie wurden die Syntheseprodukte der Aldosteronsynthase (Corticosteron (B), 18 OH-B und das Aldosteron) aufgetrennt und gemessen. Lag nach der Transfektion der COS-7 Zellen mit den Plasmiden ein Aktivitätsverlust der Stoffwechselleistung der Aldosteronsynthase vor, fand man in der folgenden Messung nur den DOC-Peak. Dies ist vergleichbar mit dem Ergebnis der Zellen, die mit der leeren pcDNA transfiziert wurden.

Bei der Transfektion mit dem Plasmid I339T waren sowohl der DOC-Peak, als auch die Peaks der Syntheseprodukte ausgeprägt. Diese ist vergleichbar mit dem Aktivitätsprofil des WT.

Die Messungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms Rita TLC Analysis ausgewertet und die Ergebnisse anschließend in Relation zum Wildtypen gesetzt. Weiter wurden die Ergebnisse nach dem Proteingehalt korrigiert. Die Bestimmung der Restaktivität der Aldosteronsynthese erfolgte mit 2 µmol/l zugesetzten kalten DOC, da nach Angaben in der Literatur in diesem Bereich die K_m des Enzyms liegt.

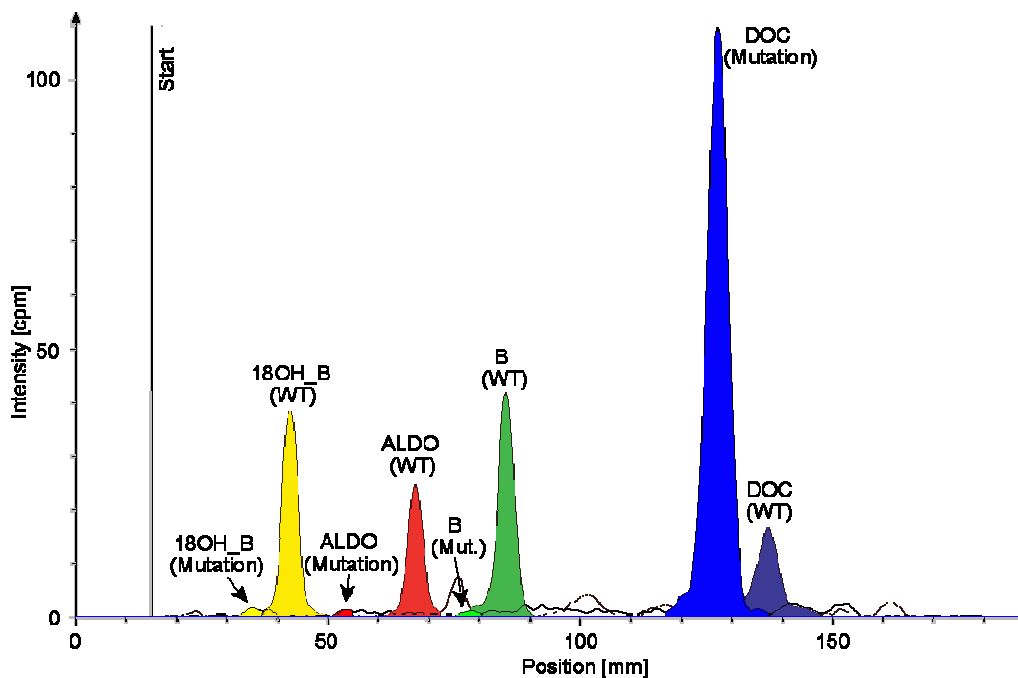


Abbildung 11: Darstellung der Steroidprofile am Beispiel der Mutation G314R im Vergleich zum WT

Bei der Auswertung der *in vitro* Aktivitätsmessung zeigte sich, dass die Zellen, die mit dem Plasmid I339T transfiziert wurden keine signifikante Einschränkung ($p=0,15$ für die Mutation I339T) der Aktivität der Aldosteronsynthese aufwiesen. Im Vergleich zum WT wurden bei der Mutation I339T 82,37 % (± 11 %) des DOCs in Aldosteron umgesetzt. Auch zeigten die Zwischenprodukte dieser Mutationen keine signifikante Einschränkungen. Bei den anderen Mutationen zeigte sich hingegen im Vergleich zum WT (=100%) eine signifikante Aktivitätsminderung ($p<0,05$) (H69P $0,75 \pm 0,2$ %, H69P/I339T $3,33 \pm 1$ %, G314R $2,45 \pm 0,6$ %, W116C $0,34 \pm 0,2$ %, G435S/W116C $0,65 \pm 0,45$ %, insT $2,57 \pm 0,6$ %, P377R $1,04 \pm 0,5$ %, R412P $1,85 \pm 1,5$ %, L451F $1,46 \pm 0,7$ %, I397N $1,77 \pm 0,4$ %, R141Q $0,38 \pm 0,1$ %).

Schaut man sich dazu den Kontrollvektor pcDNA3 an, fällt hier eine Restaktivität von 2,77% auf, somit reflektieren die eben genannten Aktivitäten eine fehlende Aldosteronsyntheseaktivität. Auf Grund der geringen Restaktivität der Aldosteronsynthese konnte über die Zwischenprodukte 18OHB und B keine Aussage gemacht werden.

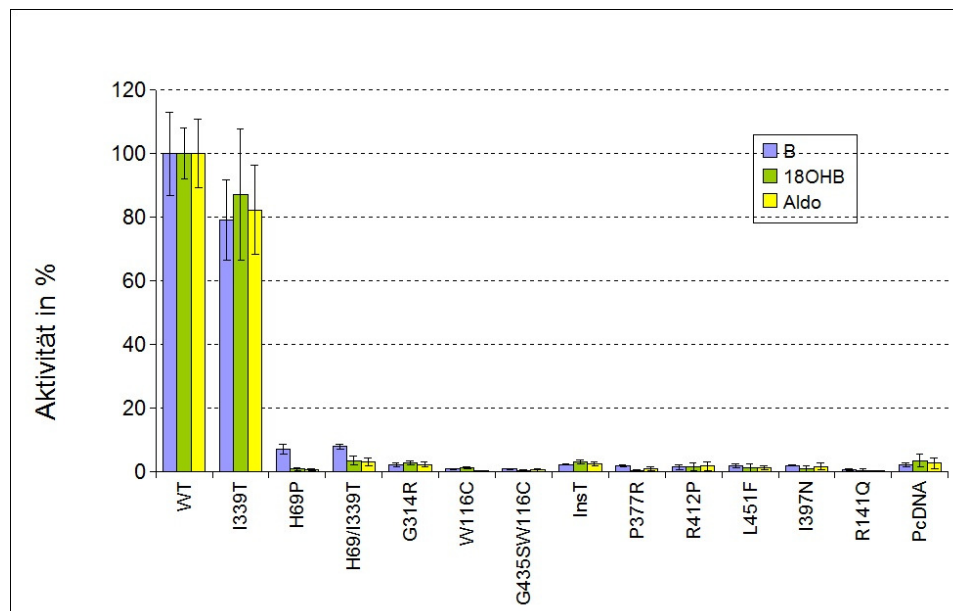


Abbildung 12: Relative Aldosteronsynthese der Mutationen im Vergleich zum WT

4.5 Alignments der Aldosteronsynthese zwischen verschiedenen Spezies

Zur weiteren Abschätzung der Relevanz der untersuchten Mutationen in der Aminosäuresequenz wurden Alignments zwischen verschiedenen Spezies angefertigt. Hier zeigte sich eine Konservierung der Aminosäuren H69, W116, R141, G314, P377, R412 und L451. Durch die Mutationen werden Aminosäuren mit polarer Seitenkette (z.B. Histidin, Arginin) und somit hydrophilen Eigenschaften gegen Aminosäuren mit apolarer Seitenkette und somit hydrophoben Eigenschaften oder auch anders herum (z.B. Tryptophan, Glycin, Prolin, Leucin) ausgetauscht.

Bei der Position I339 zeigte sich nur beim Homo sapiens die Aminosäure Isoleucin, bei allen anderen Spezies findet sich hier die Aminosäure Alanin. Auch bei der Position I397 konnte eine Abweichung gefunden werden. Hier konnte die Aminosäure Isoleucin nur noch bei dem Hausmeerschweinchen gesehen werden, die anderen Spezies zeigen hier die Aminosäure Valin. Diesen vier Aminosäuren gemeinsam sind die apolaren Seitenketten, so dass eine Konformationsänderung des Proteins unwahrscheinlich ist.

4.6 Allelfrequenz der Polymorphismen

Da bei der Untersuchung der Mutation I339T eine normale Stoffwechselaktivität der Aldosteronsynthese festgestellt wurde, wurde diese auf die Häufigkeit des Vorkommens in der Europäischen Bevölkerung im Vergleich zur Bevölkerung des Nahen Osten untersucht. Es wurde vorhandene DNA von Patienten aus dem Archiv der Kinderklinik Kiel verwendet, bei denen klinisch kein Aldosteronsynthesedefekt vorhanden war. Von dieser Patienten-DNA wurden SnaP-Shots angefertigt und mittels GeneScan Analysis Software 3.1 dargestellt.

Die Analyse der Proben zeigte bei den Patienten aus dem Nahen Osten in 20 % auf einem Allel der Nukleotidaustausch Thymidin gegen Cytosin. Auf den Allelen der Europäern konnte lediglich in 3,45 % der Fälle c.1017T/C nachgewiesen werden. Hingegen wiesen 80 % der Patienten aus dem Nahen Osten die Allele c.1017T/T auf.

Der Unterschied ist statistisch signifikant mit $p < 0,05$.

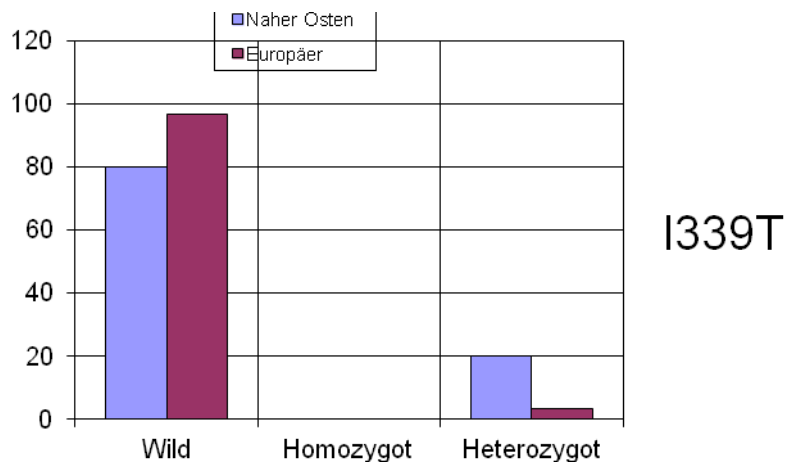


Abbildung 13: Darstellung der Häufigkeit der Mutation I339T bei Europäern im Vergleich zur Bevölkerung im Nahen Osten

Eine Homozygotie konnte weder bei den Patienten aus dem Nahen Osten, noch bei einem der Europäer gefunden werden.

5 Diskussion

In der vorgelegten Arbeit wurde die Aktivität der Aldosteronsynthese und ihrer Veränderung durch Mutationen im CYP11B2 Gen mittels in vitro-Studien untersucht. Die Mutationen wurden zum größten Teil im Patientengut der Kinderklinik des UK-SH gefunden oder aus eingeschicktem Material anderer Kliniken identifiziert.

Bei den Mutationen handelt es sich zum Teil um schon publizierte Mutationen. Es finden sich bei den untersuchten Mutationen vor allem Punktmutationen, die eine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge haben und somit eine Strukturänderung des Enzyms. Bei einer Mutation liegt eine Deletion vor, die zu einer Leserasterverschiebung führt. Ebenso wie bei den schon publizierten Mutationen (vgl. Tabelle 3 im Anhang) haben auch die Mutationen dieser Arbeit eine Verminderung der Enzymaktivität zur Folge. Lediglich die Mutation I339T zeigt eine diskrete Verminderung der Aldosteronsyntheseaktivität und ist somit am ehesten ein Polymorphismus.

5.1 Genotypen

Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten fielen alle in den ersten Lebenstagen durch Erbrechen, Gedeihstörung, Durchfälle und intermittierendes Fieber auf. Im Labor waren eine Hyperkaliämie, Hyponatriämie, eine erhöhte Plasma-Renin-Aktivität und eine metabolische Azidose zu erkennen. Bei weiteren Untersuchungen zeigten sich veränderte Hormonspiegel, die auf einen Defekt der Aldosteronsynthese hindeuteten. Auf DNA-Ebene zeigten sich dann die oben erwähnten Mutationen. Bei dieser Erkrankung liegt ein autosomal-rezessiver Erbgang vor. Dies deckt sich mit unseren Patienten 4, 5 und 6, die homozygot für die Mutationen I397N, L451F und P377R waren und bei denen die Erkrankung in voller Ausprägung zu sehen war. Dass ein homozygot auftretender Basenaustausch die Aldosteronsyntheseaktivität in hohem Maße beeinträchtigen kann, wurde anhand von vorherigen Studien bereits gezeigt. In Untersuchungen zur Mutation E255X konnte in homozygoter Ausprägung ein kompletter Verlust der Enzymaktivität gesehen werden [21]. Die Patienten 3, 7 und 8 dieser Arbeit waren für die untersuchten Mutationen I339T, H69P und R141Q und R412P heterozygot. Hier konnte immer noch eine zweite Mutation gefunden werden, so dass es sich am ehesten um eine compound Heterozygotie handelt, wo jedes Allel durch eine weitere Mutation inaktiviert wird und somit das Krankheitsbild zu erklären war. Auch dies konnte in einem Case report bezüglich der Mutationen E255X und Q272X schon

gezeigt werden [22].

Bei den Patienten 1 und 2 konnte nur auf einem Allel eine Mutation nachgewiesen werden (G314R, W116C), wodurch der Aldosteronsynthesemangel genetisch nicht bewiesen werden kann. In der Literatur ist durch Peter et al. ein solcher Patient untersucht worden, der lediglich heterozygot für die Mutation V386A war und ebenfalls symptomatisch bezüglich eines Aldosteronmangelsyndroms war [21]. Als mögliche Erklärung muss in solchen Fällen an Mutationen im Bereich der Introns oder heterozygote Gendelektionen gedacht werden [3]. Intronbereiche werden aufgrund ihres Umfangs nicht komplett sequenziert. Führt eine Mutation nun zu einem alternativen Splicing, kann es zum kompletten Verlust eines oder mehrerer Exons kommen. Diese Veränderungen können folgend zu fehlerhaften Proteinen führen. Deletionen werden durch die verwendeten Untersuchungsverfahren nicht detektiert.

5.2 Funktionelle Untersuchungen der Mutationen

In der Western Blot Analyse konnte die Expression der mutierten Aldosynthase nachgewiesen werden. Einige Mutationen zeigten eine schwächere Bandenintensität als andere. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Bandenintensität und einem Aktivitätsverlust erbracht werden. So zeigte sich lediglich bei den Mutationen I397N, G314R und der Doppelmutante H69P/I339T ein deutlicher Verlust der Bandenintensität im Vergleich zum Wildtyp. Andere Mutationen, wie z.B. die H69P, W116C oder L451F zeigten hingegen trotz deutlichem Aktivitätsverlust eine höhere Intensität der spezifischen Bande. Ob eine quantitative Änderung der Aldosteronsynthase durch die Mutationen vorlag, kann durch Western Blot nicht verlässlich geklärt werden. Es ist möglich, dass Konformationsänderungen des Enzyms die Affinität des Antikörpers verändern, oder dass effektiv weniger Enzym vorhanden ist, da dieses schneller proteolysiert wird oder in geringerem Maße translatiert wird.

Die Mutationen betrafen nicht die Carboxyterminale mitochondriale Zielsequenz der Aldosteronsynthase. Daher konnte in der Immunfluoreszenz weiterhin die korrekte mitochondriale Lage der Aldosteronsynthase bestätigt werden. Die Lokalisation des Enzyms war also weiterhin korrekt und es liegt nahe, dass die Einschränkungen der Aktivität der Aldosteronsynthase durch einen Funktionsverlust durch die Mutationen erklärt werden können.

Die in dieser Arbeit betrachteten Alignments zwischen den Proteinsequenzen der verschiedenen Spezies zeigten im Codon 69, 116, 141, 314, 377, 412 und 451 konservierte Aminosäuren welche zur Struktur- und Funktionserhaltung der Aldosteronsynthase essentiell sind [23]. An den Positionen 339 und 397 hingegen konnten Abweichung der Sequenzen zwischen den Spezies gefunden werden. Beim Homo sapiens wurde die Aminosäure Isoleucin an einer Stelle nachgewiesen, an der sich bei allen anderen Spezies Alanin bzw. Valin befand. Bei allen 3 Aminosäuren handelt es sich jedoch um apolare Seitenketten. Durch die Mutation I339T ändert sich jedoch die Polarität an Position 339, so dass zu mutmassen ist, dass es hierdurch zu keiner relevanten Änderung der Tertiärstruktur des Proteins kommt.

Betrachtet man nun die einzelnen Mutationen näher fällt auf, dass die veränderten Aminosäuren der Mutationen H69P, W116C, G314R, P377R, I397N und R412P eine entgegengesetzte Polarität haben. Dadurch wird durch die Änderung der Sekundärstruktur auch die Tertiärstruktur der Aldosteronsynthase wahrscheinlich nachhaltig gestört. Dies zeigte schon die Arbeit von Nguyen, in welcher ebenfalls Alignments des CYP11B1- und CYP11B2-Gens gebildet wurden. Auch hier zeigte sich, dass durch Änderung der Polarität der Aminosäuren die Tertiärstruktur nachhaltig gestört wird [24]. Mit diesem Wissen kann man sich nun erklären, dass auch die Funktion der Aldosteronsynthase eingeschränkt oder sogar eingestellt ist. Als Beispiel sei hier die Mutation im Codon 412 angeführt, wo die hydrophile Aminosäure Arginin gegen Prolin getauscht wird. Bereits 2005 zeigte Kuribayashi [25], dass die Mutation G314R im CYP11B1-Gen die Hydroxylaseaktivität stark einschränkte und so zu einem Steroidmangel führte. Auch die Mutation im Codon 314 bei der Glycin, eine neutrale, hydrophobe Aminosäure, gegen Arginin, eine basisch, hydrophile Aminosäure getauscht wird verändert die Sekundärstruktur nachhaltig, so dass sich hier die von uns gesehene Aktivitätsminderung im CYP11B2 Gen erklärt.

Wird Arginin im Codon 141 gegen Glutamin getauscht, zeigte sich eine deutliche Aktivitätsminderung. Ursächlich ist der Wechsel einer basischen Aminosäure (Arginin) durch eine neutrale (Glutamin) Aminosäure.

Findet sich die Mutation im Codon 116 und findet dort der Aminosäureaustausch von Tryptophan zu Cystein statt, kann es durch Änderung der Polarität der Seitenkette zur Konformationsänderung der Tertiärstruktur kommen, welche die Aufnahme des Substrats und die Abgabe des Produktes ungünstig beeinflussen können. Dies wurde 2005 von Krone [26]

anhand des CYP11B1-Gen nachgewiesen und ist auf Grund der hohen Homologie auf das CYP11B2-Gen übertragbar.

Das Alignment im Bereich des Codons 451 zeigt, dass die Aminosäure Leucin in der Aminosäuresequenz der verglichenen Spezies konserviert ist und man so eine wichtige Rolle in der Struktur und der Funktion annehmen muss. Nguyen [27] untersuchte diese Mutation bereits näher und konnten Anhand des 3D-Modells nachweisen, dass nicht die unterschiedliche Polarität, sondern die Größe der Seitenkette die Eigenschaften dieser Region soweit beeinflussten, dass die Funktion des Enzyms nachhaltig gestört ist.

Leserasterverschiebungen bedingt durch eine Insertion haben in den meisten Fällen einen kompletten Aktivitätsverlust zur Folge, da die Proteinsequenz und damit die Struktur nachhaltig gestört ist [28].

Stellt sich zuletzt die Frage, warum die Mutation im Codon 339 nur zu einem unwesentlichen Aktivitätsverlust führt. Im Vergleich der Aminosäuresequenzen ist ersichtlich, dass die Sequenzen aller Spezies im Codon 339 die Aminosäure Alanin zeigen. Im CYP11B2 Gen des Homo sapiens hingegen findet man hier die Aminosäure Isoleucin. Im nahe verwandten CYP11B1 Gen findet sich jedoch ein Alanin. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Region des Enzyms keinen wesentlichen Einfluss auf die Struktur und somit auf die Aktivität der Aldosteronsynthase hat. Auch Porrat kam 2001 zu diesem Ergebnis [29]. Unter anderem wurden in dieser Studie isolierte in vitro Messungen der Aldosteronsynthaseaktivität nach Einbringen der Mutation I339T durchgeführt. Es kam auch hier zu keinem relevanten Verlust der Enzymaktivität. Dass der Patient Nr. 4 nun erkrankt ist, liegt somit am ehesten an der zweiten detektierten Mutation H69P.

5.3 Prävalenz des Polymorphismus I339T

Während der Untersuchungen der Mutationen zeigte sich bei der Mutation I339T nur eine unbedeutende Aktivitätsminderung der Aldosteronsynthase. In den weiteren Untersuchungen legte sich der Verdacht nahe, dass es sich hierbei um einen Polymorphismus handelte, da die Prävalenz in den Stichproben über einem Prozent lag.

Größer angelegte Untersuchungen wurden diesbezüglich im Rahmen des internationalen HapMap Projektes durchgeführt. Die Europäische Population, bestehend aus jeweils Vater, Mutter und Kind, umfasste 30 Familien. Zwei asiatische Kollektive umfassten 45 nicht-verwandte Chinesen zum einen und 44 nicht verwandte Japaner zum anderen. Eine

afrikanische Gruppe bestand aus 30 Familien (jeweils Vater, Mutter und Kind). In den Untersuchungen der Mutation I339T zeigte sich, dass die Europäer zu 100% den Wildtyp auf beiden Allelen aufwiesen. Die Asiaten waren in 2 bis 8 % der Fälle heterozygot für die Mutation. Bei den Afrikanern konnte mit 44 % eine Häufung des mutierten Allels festgestellt werden. So zeigten sich 20 % homozygot für die Mutation und nur 32 % waren für den Wildtypen homozygot.

In unseren Stichproben konnten nur heterozygote Patienten für den Polymorphismus gefunden werden. Aussagen bezüglich homozygoter Patienten ließen sich auch in der Literatur nicht finden. In der Zusammensicht der Daten aus dem HapMap Projektes ist ein Polymorphismus wahrscheinlich, welcher v.a. im Nahen Osten, wie auch in Afrika auftritt [20].

6 Zusammenfassung

Aus dem Patientengut der Kinderklinik des UK-SH wurden 8 Patienten für diese Arbeit ausgewählt, die durch ein Salzverlustsyndrom klinisch auffällig geworden sind. Anhand des Steroidprofils wurde die Verdachtsdiagnose eines Aldosteronsynthesedefektes geäußert. Auf DNA-Ebene konnte bei 6 Patienten eine homozygote oder compound heterozygote Mutationskonstellation detektiert werden. Bei zwei Patienten fanden sich nur heterozygote Genveränderungen. Es konnten insgesamt 8 bisher für im CYP11B2-Gen noch nicht beschriebene Mutationen identifiziert werden (G314R, W116C, H69P, P377R, R412P, R141Q, I397N, 1487/88insT). *In vitro* Studien mit rekombinant hergestellten Enzymen, die die gefundenen Mutationen trugen, zeigten die eben genannten Mutationen einen vollständigen Verlust der Aktivität der Aldosteronsynthese. Im Western Blot konnten die Translationsprodukte dargestellt werden. Schwankungen der Bandenintensität konnten nicht mit der Schwere der Aktivitätsminderung gleichgesetzt werden. Wahrscheinlicher ist, dass das Enzym durch die Mutationen nachhaltig in seiner Struktur und somit in seiner Funktion gestört wird. Eine Aussage bezüglich der Differenzierung zwischen einem CMO Typ I und Typ II, die klinisch möglich ist, war aus den *in vitro*-Studien nicht abzuleiten. Die Mutationen schränkten die Aktivität der Aldosteronsynthese soweit ein, dass die Stoffwechselprodukte nicht detailliert messbar waren.

Bei einer Mutationen (I339T) konnte nur eine geringfügige Aktivitätsminderung festgestellt werden. Weiter führende Untersuchungen zeigten, dass diese Mutation in Stichproben von Populationen aus dem Nahen Osten (Ägypten, Iran, Israel und Türkei) gehäuft auftraten. In heterozygoter Ausprägung zeigten sie keinen Krankheitswert. Es handelt sich hier somit um einen Polymorphismus.

7 Anhang

Laborbefunde	Normalwerte
Natriumausscheidung erhöht im Urin	0,3 – 1,5 mmol/kg/d (Sgl. Bis 6 Mo)
metabolische Azidose	PH-Wert: 7,35 – 7,45 pCO ₂ : 35 – 45 mmHg Bikarbonat: 21 – 28 mm
Hyperkaliämie	3,56 – 6,11 mmol/l
Hyponatriämie	132 – 147 mmol/l
erhöhte Plasma-Renin-Aktivität	< 12 Mo: 2,2 – 10,2 ng/ml * h
erniedrigte Plasma-Aldosteron-Werte	< 12 Mo: 0,11 – 0,61 mmol/l

Tabelle 2: Laborbefunde beim Aldosteronmangel

<i>Mutation</i>	<i>Exon</i>	<i>Aktivität in % der Aldosteronsynthase-Aktivität im Vergleich zum WT</i>	<i>ASM</i>	<i>Referenz</i>
DelC386X	6	0,1	II	Zhang, 1995 [8]
Del R173	3	0	II	Peter, 1998 [30]
E198D	3		II	Portrait-Doyen, 1998 [17]
E255X	4	0	I	Peter, 1998 [21]
L324Q	6	-	I	Lopez-Siguero, 1999 [31]
L461P	8	0	I	Nomoto, 1998 [32]
Q272X	5	-	Mischung I und II	Williams, 2004 [22]
R181W*	3	0-100**	II	Pascoe, 1992 [16]
R384P	7	0	I	Geley, 1995 [10]
T185I	3	-	II	Peter, 1998 [21]
T498A	9	-	II	Dunlop, 2003 [33]
V386A*	7	0	I	Pascoe, 1992 Mitsuuchi, 1992 [16, 34]
Y265X	4	-	I	Lopez-Siguero, 1999 [31]
V35del5nt	1	0	I	Mitsuuchi, 1993 [35]
W260X	4	-	I	Nguyen, 2010 [24]
S315R	5	-	I	Nguyen, 2010 [24]
R374W	6	-	I	Nguyen, 2010 [24]
T318M	5	-	I	Rubio-Cabezas, 2010 [36]
K173R	3	100	Polymorphismus	Fardella, 1996 [19]
* Nur in homozygoter Form symptomatisch				
** In vitro normale 11 β -Hydroxylase-, verminderte 18-Hydroxylase- und nicht messbare 18-Oxidaseaktivität				

Tabelle 3: Publierte Mutationen des CYP 11B2-Gens bei ASM

Patient Nr.	m/w	Geb.-dat.	Geb.-gewicht [g]	Gewicht bei Diagnose [g]	Alter bei Diagnose [Wochen]	Na⁺ [mmol/l]	K⁺ [mmol/l]	PRA [ng/ml*h]	Aldosteron [nmol/l]	Herkunft
1	w	*	3700	3200	4	128	7,7	250	0,05	Italien
2	m	*	3300	↓	4	↓	↑	*	0,2	*
3	m	24.11.82	3990	3860	8	126	6,4	27	<0,05	Niederlande
4	m	*	3020	↓	5	119	6,6	24-43	0,028	Israel
5	m	24.07.00	2270	↓	4	125	8	55	0,64	Deutschland
6	w	03.03.90	3500	3300	3	125	6,8	↓	0,05	Türkei
7	w	11.08.96	3000	2800	4	125	6	*	*	Ungarn
8	w	16.09.89	3440	3490	7	114	5,2	87	0,08	Deutschland
9	m	07.05.97	2900	2900	2	126	8,3	>50	0,085	Deutschland
* nicht bekannt										

Tabelle 4: Klinische Daten und Herkunft der Patienten

<i>Mutation</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequence in 5' → 3' Richtung</i>	<i>Sense</i>
G314R	G314R-F	CTATGGAACTCACTGCAaGGAGCGTGGACACGACA GCG	+
	G314R-R	GATACCTTGAGTGACGTtCCTCGCACCTGTGCTGT CGC	-
G435S	G435S-F	CATCAGGGGCTCCaGCAGGAACTTCCACC	+
	G435S-R	GGTGAAGTTCCTGCTtGGAGCCCCTGATG	-
H69P	H69P-F	GCACCTGGAGATGCcCCAGACCTTCCAGG	+
	H69P-R	CCTGGAAGGTCTGGgGCATCTCCAGGTGC	-
I339T	I339T-F	GACGTGCAGCAGAcCCTGCGCCAGGAG	+
	I339T-R	CTCCTGGCGCAGGgtTCTGCTGCACGTC	-
I397N	I397N-R	CAGAACTACCACAaCCCAGCTGGGACA	+
	I397N-F	TGTCCCAGCTGGGtTGTGGTAGTTCTG	-
insT 1487 1488	insT 1487 1488-F	GGCACGTCCCCCCTtCCTCACTTTTCAGAG	+
	insT 1487 1488-R	CTCTGAAAGTGAGGaAGGGGGGACGTGCC	-
L451F	L451F	GGCATGCGCCAGTGCTtTCGGGCGGCGCCTGG	+
	L451F	CCAGGCGCCGCCCGaAGCACTGGCGCATGC	-
P377R	P377R-F	GACCTTGAGGCTCTACCGtGTGGGTCTGTTTTTGG	+
	P377R-R	CCAAAAACAGACCCACAcGGTAGAGCCTCAAGGTC	-
R141Q	R141Q-F	GAATGGCGCTTCAACCaATTGCGGCTGAACCC	+
	R141Q-R	GGTTTCAGCCGCAAtTGGTTGAAGCGCCATTC	-
R412P	R412P-F	TACTCGCTGGGTCCcCAATGCCGCCTTG	+
	R412P-R	CAAGGCGGCATTGgGACCCAGCGAGTA	-
W116C	W116C-F	GATCCTGGAGCCCTGTGtGGCCTACAGACAAC	+
	W116C-R	GTTGTCTGTAGGCCaCACAGGGCTCCAGGATC	-

Tabelle 5: Oligonucleotidprimer für die Mutagenese

<i>Primer</i>	<i>Sequenz in 5' → 3' Richtung</i>	<i>Sense</i>	<i>Annealing Temperatur</i>
T7 fwd	AAT ACG ACT CAC TAT AGG GA	+	52 °C
Primer 1-3	CTC AGG GCA AAG GCA	+	52 °C
Primer 2	CTG ACC CAG GTG GAC AGC	+	48 °C
Primer 3	GAG CGT CAT CAG CAA GGG	-	48 °C
Primer 5	GGT GAC AAC TGT ATC CAG	+	52 °C
Sp6 rev	CAT TTA GGT GAC ACT A	-	52 °C

Tabelle 6: Sequenzierungsprimer und Annealing Temperaturen

<i>Schritt</i>	<i>Bedingungen</i>
Waschen	Mit 1x PBS
Inkubation	259 µl Trypsin für 5 min bei 37°C und 4,7% CO ₂
Reaktionsstopp	1 ml Dubecco's MEM+
Zentrifugation	5000 rpm für 5 min
Waschen	500µl 1 x PBS
Zentrifugation	5000 rpm für 5 min
Lösen	150 µl 1 x PBS
Lysierung der Zellen	10 sek Ultraschall
Reaktionsstopp	Lagerung auf Eis
Zentrifugation	5000 rpm 5 min

Tabelle 7: Protokoll zur Zellenernte

Tris4,55gGlycin21,6gMethanol150mlAqua bidest1500ml

Tabelle 8: Transferpuffer

<i>Polymorphismus</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequenz in 5` → 3`-Richtung</i>	<i>Sense</i>
I339T	I339T-SPM-F	5`- GGA ACC CCG ACG TGC AGC AGA - 3`	+

Tabelle 9: Sequenzen der SNaPShot-Primer

<i>Patient Nr.</i>	<i>Mutation</i>	<i>Exon</i>	<i>Basentausch</i>	<i>Aminosäuretausch</i>
1	c.941 G>A	5	GGG → AGG	Glycin → Arginin
3	c.349 G>T	2	TGG → TGT	Tryptophan → Cystein
4	c.207 A>C	1	CAC → CCC	Histidin → Prolin
5	c.1192 T>A	7	ATC → AAC	Isoleucin → Asparagin
6	c.1352 C>T	8	CTC → TTC	Leucin → Phenylalanin
7	c.1132 C>G	7	CCT → CGT	Prolin → Arginin
8	c.423 G>A	3	CGA → CAA	Arginin → Glutamin
9	c.1236 G>C	8	CGC → CCC	Arginin → Prolin
9	1487insT	9	CT-C → CTTC	Leserasterverschiebung

Tabelle 10: CYP11B2 Mutationen dieser Arbeit

<i>Patient Nr.</i>	<i>Polymorphismus</i>	<i>Exon</i>	<i>Basentausch</i>	<i>Aminosäuretausch</i>
4	c.1017 T>C	6	ATC → ACC	Isoleucin → Threonin

Tabelle 11: CYP11B2 Polymorphismus dieser Arbeit

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Nebennierenrinde (Quelle: Dr. Nils Krone).....	6
Abbildung 2: Steroidbiosynthese (Quelle: Dr. Nils Krone).....	7
Abbildung 3: Renin-Angiotensin-Aldosteron System (Quelle: Dr. Nils Krone).....	8
Abbildung 4: Stammbaum des Patienten 1; Erklärung s. Text	24
Abbildung 5: Stammbaum des Patienten 3; Erklärung s. Text	25
Abbildung 6: Stammbaum des Patienten 6; Erklärung s. Text	26
Abbildung 7: Stammbaum des Patienten 7; Erklärung s. Text	26
Abbildung 8: Stammbaum des Patienten 8; Erklärung s. Text	27
Abbildung 9: Western Blot	27
Abbildung 10: Immunfluoreszenzbilder; linke Bildreihe Lokalisation der CYP11B2; mittlere Bildreihe Lokalisation der Mitochondrien; rechte Bildreihe mitochondriale Lokalisation der CYP11B2.	28
Abbildung 11: Darstellung der Steroidprofile am Beispiel der Mutation G314R im Vergleich zum WT.....	29
Abbildung 12: Relative Aldosteronsynthese der Mutationen im Vergleich zum WT.....	30
Abbildung 13: Darstellung der Häufigkeit der Mutation I339T bei Europäern im Vergleich zur Bevölkerung im Nahen Osten	32

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Alignment der CYP11B2-Aminosäuresequenzen des Hamsters, des Goldhamsters, der Hausmaus, der Wanderratte, des Menschen und des Hausmeerschweines	31
Tabelle 2: Laborbefunde beim Aldosteronmangel.....	39
Tabelle 3: Publierte Mutationen des CYP 11B2-Gens bei ASM	40
Tabelle 4: Klinische Daten und Herkunft der Patienten	41
Tabelle 5: Oligonucleotidprimer für die Mutagenese	42
Tabelle 6: Sequenzierungsprimer und Annealing Temperaturen.....	43
Tabelle 7: Protokoll zur Zellenernte.....	43
Tabelle 8: Transferpuffer	43
Tabelle 9: Sequenzen der SNaPSHOT-Primer.....	43
Tabelle 10: CYP11B2 Mutationen dieser Arbeit	44
Tabelle 11: CYP11B2 Polymorphismus dieser Arbeit	44

10 Literaturverzeichnis

1. Ishimura K. and H. Fujita, *Light and electron microscopic immunohistochemistry of the localization of adrenal steroidogenic enzymes*. Microsc Res Tech., 1997. **36**(6): p. 445-53.
2. Curnow K.M., Tusie-Luna M. T., Pascoe L., Natarajan R., Gu J. L., Nadler J. L., White P. C., *The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex*. Mol Endocrinol, 1991. **5**(10): p. 1513-22.
3. White P.C., *Aldosterone synthase deficiency and related disorders*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2004. **217**: p. 81–87.
4. White P.C., *Steroid 11 beta-hydroxylase deficiency and related disorders*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2001. **30**(1): p. 61-79, vi.
5. White P., Curnow K. and Pascoe, L., *Disorders of steroid 11 beta-hydroxylase isozymes*. Endocr Rev, 1994. **15**(4): p. 421-438.
6. Ulick S., *Correction of the nomenclature and mechanism of the aldosterone biosynthetic defects*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **81**(3): p. 1299-300.
7. Peter M., Partsch C.J., and Sippell W.G., *Multisteroid analysis in children with terminal aldosterone biosynthesis defects*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(5): p. 1622-7.
8. Zhang G., Rodriguez H., Fardella C. E., Harris D. A., Miller W. L., *Mutation T318M in the CYP11B2 gene encoding P450c11AS (aldosterone synthase) causes corticosterone methyl oxidase II deficiency*. Am J Hum Genet, 1995. **57**(5): p. 1037-43.
9. Peter M., Fawaz L., Drop S. L. S., Visser H. K. A., Sippell W.G, *Hereditary Defect in Biosynthesis of Aldosterone: Aldosterone Synthase Deficiency 1964-1997*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(11): p. 3525-3528.
10. Geley S., Johrer K., Peter M., Denner K., Bernhardt R., Sippell W. G., Kofler R., *Amino acid substitution R384P in aldosterone synthase causes corticosterone methyl oxidase type I deficiency*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(2): p. 424-9.
11. Rosler A., *The natural history of salt-wasting disorders of adrenal and renal origin*. J Clin Endocrinol Metab, 1984. **59**: p. 689-700.
12. Mornet E., Dupont J., Vitek A., White P.C., *Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta- hydroxylase (P-450(11) beta)*. J. Biol. Chem., 1989. **264**(35): p. 20961-20967.
13. Kawamoto T., Mitsuuchi Y., Ohnishi T., Ichikawa Y., Yokoyama Y., Sumimoto H., Toda K., Miyahara K., Kuribayashi I., Nakao K., *Cloning and expression of a cDNA for human cytochrome P-450aldo as related to primary aldosteronism*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **173**: p. 309-316.
14. Lisurek M. and Bernhardt R, *Modulation of aldosterone and cortisol synthesis on the molecular level*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2004. **Volume 215**(1-2): p. 149-159.
15. Bechtel S., Belkina N., and Bernhardt R., *The effect of amino-acid substitutions I112P, D147E and K152N in CYP11B2 on the catalytic activities of the enzyme*. Eur J Biochem, 2002. **269**(4): p. 1118-27.
16. Pascoe L., Curnow K. M., Slutsker L., Rosler A., White, P. C., *Mutations in the human CYP11B2 (aldosterone synthase) gene causing corticosterone methyl oxidase II deficiency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(11): p. 4996-5000.

17. Portrat-Doyen S., Tourniaire J., Richard O., Mulatero P., Aupetit-Faisant B., Curnow K. M., Pascoe L. Morel Y., *Isolated aldosterone synthase deficiency caused by simultaneous E198D and V386A mutations in the CYP11B2 gene.* J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(11): p. 4156-61.
18. Bünger K., *Identifizierung von Mutationen im CYP 11B2-Gen bei Patienten mit kongenitalem isoliertem Hypoaldosteronismus.* 2002.
19. Fardella C.E., Rodriguez H., Montero J., Zhang G., Vignolo P., Rojas A., Villarroel L., Miller W. L., *Gene conversion in the CYP11B2 gene encoding P450c11AS is associated with, but does not cause, the syndrome of corticosterone methyloxidase II deficiency.* J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(1): p. 321-6.
20. Leshinsky-Silver E., Landau Z., Unlubay S., Bistrizer T., Zung A., Tenenbaum-Rakover Y., Devries L., Lev D., Hanukoglu A., *Congenital hyperreninemic hypoaldosteronism in Israel: sequence analysis of CYP11B2 gene.* Horm Res, 2006. **66**(2): p. 73-8.
21. Peter M., Bunker K., Drop S. L., Sippell W. G., *Molecular genetic study in two patients with congenital hypoaldosteronism (types I and II) in relation to previously published hormonal studies.* Eur J Endocrinol, 1998. **139**(1): p. 96-100.
22. Williams T.A., Mulatero P., Bosio M., Lewicka S., Palermo M., Veglio F., Armanini D., *A Particular Phenotype in a Girl with Aldosterone Synthase Deficiency.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(7): p. 3168-3172.
23. Bottner B., Denner K., Bernhardt R., *Conferring aldosterone synthesis to human CYP11B1 by replacing key amino acid residues with CYP11B2-specific ones.* Eur J Biochem, 1998. **252**(3): p. 458-66.
24. Nguyen H., Hannemann F., Hartmann M. F., Malunowicz E. M., Wudy S. A., Bernhardt R., *Five novel mutations in CYP11B2 gene detected in patients with aldosterone synthase deficiency type I: Functional characterization and structural analyses.* Molecular Genetics and Metabolism, 2010. **100**: p. 357-364.
25. Kuribayashi I., Nomoto S., Massa G., Oostdijk W., Wit J. M., Wolffenbuttel B. H., Shizuta Y., Honke K., *Steroid 11-beta-hydroxylase deficiency caused by compound heterozygosity for a novel mutation, p.G314R, in one CYP11B1 allele, and a chimeric CYP11B2/CYP11B1 in the other allele.* Horm Res, 2005. **63**(6): p. 284-93.
26. Krone N., Riepe F. G., Götze D., Korsch E., Rister M., Commentz J., Partsch C. J., Grotzinger J., Peter M., Sippell W. G., *Congenital adrenal hyperplasia due to 11-hydroxylase deficiency: functional characterization of two novel point mutations and a three-base pair deletion in the CYP11B1 gene.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(6): p. 3724-30.
27. Nguyen H.H., Hannemann F., Hartmann M. F., Wudy S. A., Bernhardt R., *Aldosterone synthase deficiency caused by a homozygous L451F mutation in the CYP11B2 gene.* Mol Genet Metab, 2008. **93**(4): p. 458-67.
28. Charfeddine I.B., Riepe F. G., Kahloul N., Kulle A. E., Adala L., Mami O., Amara A. Mili A., Amri F., Saad A., Holterhus P.-M., Gribaa M., *Two novel CYP11B1 mutations in congenital adrenal hyperplasia due to steroid 11b hydroxylase deficiency in a Tunisian family.* General and Comparative Endocrinology, 2012. **175**: p. 514-518.
29. Portrat S., Mulatero P., Curnow K. M., Chaussain J. L., Morel Y., Pascoe L., *Deletion hybrid genes, due to unequal crossing over between CYP11B1 (11beta-hydroxylase) and CYP11B2(aldosterone synthase) cause steroid 11beta-hydroxylase deficiency and congenital adrenal hyperplasia.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(7): p. 3197-201.
30. Peter M., Nikischin W., Heinz-Erian P., Fussenegger W., Kapelari K., Sippell W. G., *Homozygous deletion of arginine-173 in the CYP11B2 gene in a girl with congenital*

- hypoaldosteronism. Corticosterone methyloxidase deficiency type II.* Horm Res, 1998. **50**(4): p. 222-5.
31. Lopez-Siguero J.P., Garcia-Garcia E., Peter M., Sippell W. G., *Aldosterone synthase deficiency type I: hormonal and genetic analyses of two cases.* Horm Res, 1999. **52**(6): p. 298-300.
 32. Nomoto S., Massa G., Mitani F., Ishimura Y., Miyahara K., Toda K., Nagano I., Yamashiro T., Ogoshi S., Fukata J., Onishi S., Hashimoto K., Doi Y., Imura H., Shizuta Y., *CMO I deficiency caused by a point mutation in exon 8 of the human CYP11B2 gene encoding steroid 18-hydroxylase (P450C18).* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **234**(2): p. 382-5.
 33. Dunlop F.M., Crock P. A., Montalto J., Funder J. W., Curnow K. M., *A Compound Heterozygote Case of Type II Aldosterone Synthase Deficiency.* J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(6): p. 2518-2526.
 34. Mitsuuchi Y., Kawamoto T., Naiki Y., Miyahara K., Toda K., Kuribayashi I., Orii T., Yasuda K., Miura K., Nakao K., *Congenitally defective aldosterone biosynthesis in humans: the involvement of point mutations of the P-450C18 gene (CYP11B2) in CMO II deficient patients.* Biochem Biophys Res Commun, 1992. **182**(2): p. 974-9.
 35. Mitsuuchi Y., Kawamoto T., Miyahara K., Ulick S., Morton D. H., Naiki Y., Kuribayashi I., Toda K., Hara T., Orii T., *Congenitally defective aldosterone biosynthesis in humans: inactivation of the P-450C18 gene (CYP11B2) due to nucleotide deletion in CMO I deficient patients.* Biochem Biophys Res Commun, 1993. **190**(3): p. 864-9.
 36. Rubio-Cabezas O., Regueras L., Muñoz-Calvo M. T., Bartolomé M., Pozo J., Argente J., *Primary hypoaldosteronism and moderate bilateral deafness in a child with a homozygous missense mutation (Thr318Met) in the CYP11B2 gene.* Anales de pediatria, 2010. **73**(1): p. 31-34.

11 Danksagung

Zunächst gilt mein größter Dank meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. F. G. Riepe für die Bereitstellung des Themas und die hilfreiche und wohlwollende Unterstützung, in der Endphase der Fertigstellung meiner Dissertation. Er war in dieser Zeit für anfallende Probleme stets erreichbar und konnte mit konstruktiven Lösungsvorschlägen weiterhelfen, ohne die diese Arbeit wohl nicht beendet worden wäre.

Zum Gelingen dieser Arbeit haben auch Tanja Dahm, Gila Hohmann und die anderen Mitarbeiter des pädiatrisch-endokrinologischen Labors wesentlich beigetragen. Für deren sachkundige Einführung in die Labortechnik und große Hilfsbereitschaft möchte ich mich herzlich bedanken ebenso auch für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die ich sehr geschätzt habe.

Danke sage ich auch meinen Eltern und Freunden, die mich stets mit Rat und Tat unterstützt haben, und mir die notwendige Kraft für die Beendigung der Dissertation gegeben haben.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten	Name:	Dorothea Götze
	Adresse:	Projensdorferstraße 231, 24106 Kiel
	Geburtsdatum:	02.07.1981
	Geburtsort:	Clausthal-Zellerfeld
Schulabschluss	07/2000	Allgemeine Hochschulreife, Robert-Koch-Gymnasium, Clausthal-Zellerfeld
Hochschulausbildung	10/2000-06/2007	Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
	09/2002	Physikum
	09/2003	1. Staatsexamen
	04/2006	2. Staatsexamen
	06/2007	3. Staatsexamen
Praktisches Jahr	04/2006-08/2006	Innere Medizin, Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster
	08/2006-11/2006	Neurologie, Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster
	11/2006-03/2007	Chirurgie, Kreiskrankenhaus, Rendsburg
Facharztausbildung	08/2007 – 09/2011	Innere Abteilung, Klinik Preetz
	10/2011 – heute	Medizinische Klinik, Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster
Publikation	Krone N, Riepe FG, Götze D, Korsch E, Rister M, Commentz J, Patsch CJ, Grötzinger J, Peter M, Sippell WG (2005) Congenital adrenal hyperplasia due to 11-hydroxylase deficiency: functional characterization of two novel point mutations and a three-base pair deletion in the CYP11B1 gene. J Clin Endocrinol Metab. 90(6):3724-30	