

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. R. Wanke

Angefertigt am Institut für Physiologie der Universität Regensburg

(Univ.-Prof. Dr. H. Castrop)

**Bedeutung der WNK3-Kinase für die Salz-, Wasser- und
Blutdruckhomöostase *in vivo***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Katharina Maria Theresa Mederle

aus Regensburg

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Wanke

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Ritzmann

Tag der Promotion: 9. Februar 2013

Per aspera ad astra

(Auf rauher Bahn zu den Sternen)

Nach Seneca, „Hercules furens“

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Grundlagen des Ionentransports der Niere	2
1.1	Aufgaben der Niere	2
1.2	Struktur der Niere.....	2
1.2.1	Das Nephron.....	2
1.2.2	Das Tubulussystem	2
1.3	Wichtige Ionentransporter der Niere.....	4
1.3.1	NKCC1	4
1.3.2	NKCC2.....	5
1.3.3	NCC.....	6
1.3.4	KCC.....	6
1.3.5	ROMK.....	6
1.3.6	ENaC	7
1.4	Wichtige Hormone der Regulation von Blutdruck und Nierenfunktion	7
1.4.1	RAAS	7
1.4.2	Vasopressin	8
2.	WNK-Kinasen.....	9
2.1	Die Familie der WNK-Kinasen und ihre Funktion in der Niere	9
2.2	Gemeinsame Strukturmerkmale der WNK-Kinasen.....	10
2.3	WNK-Kinasen: Expression und Isoformen.....	11
2.3.1	WNK1	11
2.3.2	WNK2	11
2.3.3	WNK3	12
2.3.4	WNK4	12
2.4	Wichtige Intermediärkinasen bei WNK-abhängigen Signalwegen	12
2.4.1	SPAK/ OSR1	12
2.4.2	SGK1	13
2.4.3	PI3-Kinase.....	13
2.5	Regulation von Ionenkanälen durch WNK-Kinasen <i>in vitro</i>	14
2.5.1	WNKs und NKCC1.....	14
2.5.2	WNKs und NKCC2.....	15

2.5.3	WNKs und NCC.....	16
2.5.4	WNKs und KCC.....	17
2.5.5	WNKs und ROMK.....	17
2.5.6	WNKs und ENaC.....	18
2.5.7	WNKs und TRP Kanäle.....	18
2.6	Physiologische Rolle von WNK-Kinasen: <i>in-vivo</i> -Daten.....	18
2.6.1	WNK1 und NaCl-Transport.....	20
2.6.2	WNK4 und NaCl-Transport.....	20
2.6.3	WNK1 und K-Transport.....	21
2.6.4	WNK4 und K-Transport.....	22
2.7	Beteiligung der WNK-Kinasen an pathologischen Prozessen.....	22
2.7.1	FHHt.....	22
2.7.2	Essentielle Hypertonie.....	24
2.7.3	HSANII.....	24
2.7.4	Autismus.....	24
2.7.5	Krebs.....	25
2.7.6	Osteoporose.....	25
III.	ZIELSETZUNG.....	26
IV.	VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN.....	27
1.	Versuchstiere.....	27
1.1	Generierung, Zucht und Haltung der WNK3-KO-Mäuse.....	27
1.2	Genotypisierung der WNK3-KO-Mäuse.....	27
2.	Material.....	29
2.1	Geräte.....	29
2.2	Verbrauchsmaterial.....	30
2.3	Chemikalien und Pharmazeutika.....	31
2.4	Futtermittel.....	32
3.	Methoden.....	33
3.1	Stoffwechselkäfigexperimente.....	33
3.2	Urinosmolarität.....	33
3.3	Blutdruckmessung.....	33
3.4	Blutvolumen.....	34
3.5	Glomeruläre Filtrationsrate.....	35

3.6	Renaler Blutfluss	36
3.7	Niedrigsalzversuche	38
3.8	Versuche mit Diuretika	38
3.9	Plasma- und Urinelektrolyte.....	39
3.10	Plasmarenin- und Plasmaaldosteronkonzentration.....	39
3.11	RT-PCR.....	40
3.12	Immunhistochemie	43
3.13	Western Blot.....	44
3.14	Statistik.....	44
V.	ERGEBNISSE	45
1.	Generierung einer WNK3-defizienten Maus-Linie.....	45
2.	Blutdruck und Blutvolumen.....	46
2.1	Systolischer Blutdruck	46
2.2	Plasmavolumen und Blutvolumen	47
3.	Nierendurchblutung.....	48
3.1	Renaler Blutfluss	48
3.2	Glomeruläre Filtrationsrate	49
4.	Urinexkretion und Trinkverhalten.....	50
4.1	Basale Urinosmolarität.....	50
4.2	Urinosmolarität nach 48h Wasserentzug.....	52
4.3	Urinvolumen.....	52
4.4	Trinkvolumen	53
5.	Elektrolyte.....	54
5.1	Plasmaelektrolyte	54
5.2	Urinelektrolyte	54
6.	Plasmarenin- und Plasmaaldosteronkonzentration.....	54
7.	Versuche unter Niedrigsalzbedingungen	55
7.1	Urinosmolarität.....	55
7.2	Urinvolumen.....	56
7.3	Plasmaelektrolyte	57
7.4	Urinelektrolyte	57
8.	Kompensatorische Regulation anderer WNK-Kinasen.....	57

8.1	WNK1	58
8.1.1	WNK1 mRNA Expression	58
8.1.2	WNK1 Protein Expression	59
8.2	WNK4 mRNA Expression	59
9.	SPAK/OSR1 Expression	60
10.	Expression renaler Ionentransporter	62
10.1	NKCC2	62
10.1.1	NKCC2-Immunhistochemie	62
10.1.2	NKCC2-Hemmung: Furosemid	63
10.2	NCC	63
10.2.1	NCC-Immunhistochemie	63
10.2.2	NCC-Hemmung: Hydrochlorothiazid	64
10.3	ENaC	65
10.3.1	ENaC-Immunhistochemie	65
10.3.2	ENaC-Hemmung: Amilorid	66
VI.	DISKUSSION	68
1.	WNK3-<i>in-vitro</i>-Daten	68
2.	Der renale Phänotyp der WNK3-KO-Maus	71
2.1	Blutdruck und Nierendurchblutung	71
2.2	Nierenfunktion und Elektrolytresorption	73
2.3	Niedrigsalzversuche	73
2.4	Zusammenfassung des renalen Phänotyps der WNK3-KO-Maus	75
3.	Kompensationsmechanismen bei der WNK3-KO-Maus	75
3.1	Kompensatorische Hochregulation der WNK1-Expression	75
3.2	Die WNK1-SPAK/OSR1-Achse	76
3.3	Regulation renaler Ionentransporter in Abhängigkeit von der WNK1- SPAK/OSR1-Achse	76
3.3.1	Expressionslevel renaler Ionentransporter: Immunhistochemie	76
3.3.2	Funktionelle Untersuchung renaler Ionentransporter durch spezifische Inhibition	77
3.4	Funktion der WNK1-Isoformen in der Niere	78
4.	Das Netzwerk der WNK-Kinasen in der Niere	79

5.	Ausblick: Relevanz von WNK3 bei humanen Patienten	82
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	83
VIII.	SUMMARY.....	85
IX.	LITERATURVERZEICHNIS.....	87
X.	ANHANG	106
1.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	106
2.	Abkürzungsverzeichnis.....	109
3.	Erklärungen zum Copyright.....	114
XI.	DANKSAGUNG	115

I. EINLEITUNG

Etwa 25% der Bevölkerung in den Industrieländern leiden an chronisch erhöhtem Blutdruck. Eine Hypertonie stellt einen entscheidenden Risikofaktor für das spätere Auftreten eines Schlaganfalls, eines Herzinfarktes oder eines kongestiven Herzversagens dar (O'Shaughnessy and Karet, 2006). Neben dem Herz-Kreislauf-System leistet vor allen Dingen die Niere einen essentiellen Beitrag zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Blutdrucks und bildet beim Säugetier das zentrale Organ für die Wasser- und Elektrolythomöostase. Umgekehrt gehen pathologische Veränderungen des Blutdrucks häufig mit einer gestörten Nierenfunktion einher (Mullins et al., 2006). Mindestens 50% der Patienten mit Hypertonie weisen eine salzsensitive Komponente auf und bei ca. 30% wird der Bluthochdruck vor allem durch Entgleisungen der renalen Salzhomöostase verursacht (Weinberger et al., 1982). Derzeit gelingt es nur bei 35% der Betroffenen, diese Störungen adäquat zu therapieren (Cutler et al., 2008). Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung neuer Therapieansätze. Viele der an der Pathogenese der Hypertonie beteiligten Mechanismen sind noch weitgehend ungeklärt. Eine direkt in diese Prozesse involvierte Signalkaskade, die in den vergangenen zehn Jahren zunehmend in den Fokus der Hypertonieforschung rückte, umfasst die Regulation renaler Ionentransporter durch die Familie der sogenannten WNK- Kinasen (Delpire and Gagnon, 2006; Flatman, 2007; Kahle et al., 2006). Eine fundierte Kenntnis dieser Signalwege könnte zukünftig die Entwicklung neuer therapeutischer und diagnostischer Strategien zur frühzeitigen Behandlung einer Hypertonie ermöglichen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Grundlagen des Ionentransports der Niere

1.1 Aufgaben der Niere

Die Hauptaufgabe der Niere besteht in der Bildung des Harns und in der Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, also von Stoffwechselendprodukten und Fremdstoffen. Durch die in der Niere stattfindenden Sekretions- und Resorptionsprozesse werden systemisch der Wasser- und Elektrolythaushalt, der Säure-Basen-Haushalt und letztlich auch der Blutdruck reguliert. Als Syntheseort verschiedener Hormone beeinflussen die Nieren ebenfalls den Blutdruck (Renin) sowie ferner die Blutbildung (Erythropoetin) und den Knochenstoffwechsel (Calcitriol) (Engelhardt und Breves, 2005; Klinker und Silbernagl, 2001).

1.2 Struktur der Niere

1.2.1 Das Nephron

Das Nephron ist die kleinste funktionelle Einheit der Niere, bestehend aus dem Malpighi-Körperchen (= Glomerulum-Kapillaren + Bowman-Kapsel) und dem Tubulusapparat. Durch glomeruläre Filtration des Blutplasmas wird zunächst der Primärharn (= Ultrafiltrat) gebildet. Durch Resorptions- und Sekretionsprozesse im Verlauf des Tubulussystems entsteht der Sekundärharn, dessen Volumen infolge der Konzentrierungsprozesse etwa 1% des Ultrafiltrats beträgt (Hees und Sinowatz, 2000; Klinker und Silbernagl, 2001).

1.2.2 Das Tubulussystem

Die Abschnitte des Tubulussystems lassen sich anhand von Aufbau und Funktion in den proximalen Tubulus, den Intermediärtubulus und den distalen Tubulus unterteilen. An den spät-distalen Tubulus schließen sich die Sammelrohre an, die den Abfluss des Harns aus den Nephronen in das Nierenbecken gewährleisten. Die Partes Rectae des proximalen und distalen Tubulus bilden zusammen mit dem Intermediärtubulus die Henle-Schleife, die durch das Gegenstromprinzip einen entscheidenden Beitrag zur Harnkonzentrierung bei Säugetieren und Vögeln leistet (Engelhardt und Breves, 2005; Klinker und Silbernagl, 2001).

ANATOMISCHE BEZEICHNUNG	ABKÜRZUNG	PHYSIOLOGIE
Prox. Tubulus, Pars convoluta	PCT (Proximal Convolutet Tubule)	Resorptionsprozesse: Na-gekoppelte Symporter (Glukose, AS, Phosphat) bzw Antiporter (Bicarbonat); isotone Wasserresorption Sekretionsprozesse: v.a. NH ₄
Prox. Tubulus, Pars recta	PST (Proximal Straight Tubule)	
Intermediärtubulus, Pars descendens	DTL (Descending Thin Limb)	Harnkonzentrierung durch das Gegenstromprinzip
Intermediärtubulus Pars ascendens	ATL (Ascending Thin Limb)	
Dist. Tubulus, Pars recta	TAL (Thick Ascending Limb)	Harnkonzentrierung durch das Gegenstromprinzip; Macula densa (TGF, Steuerung d. Reninsekretion)
Dist. Tubulus, Pars convoluta	DCT (Distal Convolutet Tubule)	Aldosteron-abhängige Harnkonzentrierung
Verbindungstubulus	CNT (Connecting Tubule)	Vasopressin- und Aldosteron- abhängige Harnkonzentrierung durch Wasserentzug
Sammelrohr	CD (Collecting Duct)	

Tab. 1 Die wichtigsten Strukturen des Tubulussystems und ihre Funktion (Engelhardt und Breves, 2005; Hees und Sinowatz, 2000; Klinker und Silbernagl, 2001)

1.3 Wichtige Ionentransporter der Niere

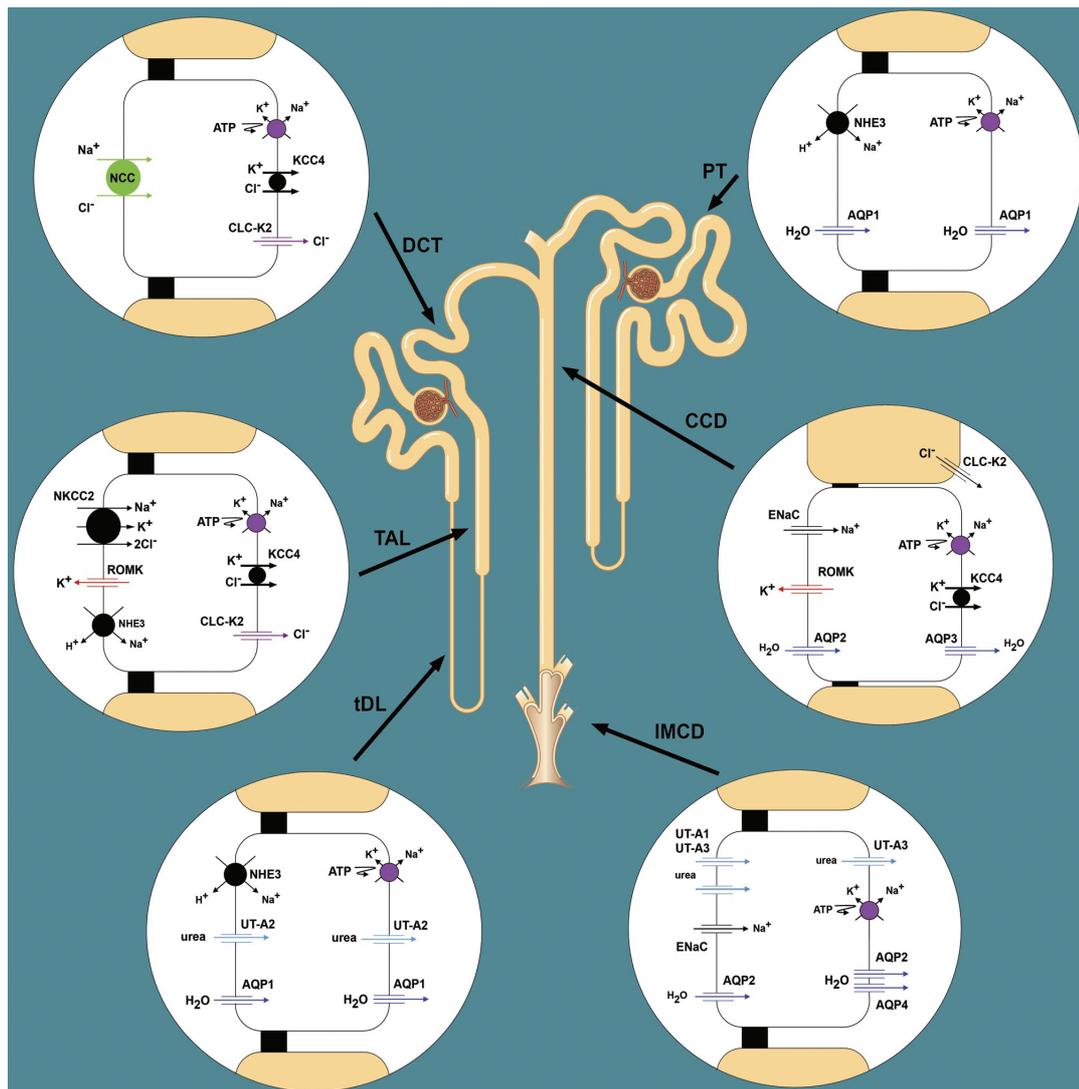


Abb.1 Die wichtigsten Ionentransporter der Niere und ihre Lokalisation im Verlauf des Nephrons (Fenton and Knepper, 2007)

1.3.1 NKCC1

Der Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter NKCC1 wird in den sezernierenden Epithelien exokriner Drüsen exprimiert (Haas and Forbush, 2000) und durch Phosphorylierung N-terminaler Threonine aktiviert. An diesem Signalweg sind auch die unter 2.4.1 näher beschriebenen Kinasen SPAK und OSR1 beteiligt (Gagnon et al., 2007a). Bei NKCC1-KO-Mäusen wurde im Vergleich zum Wildtyp eine Reduktion des Blutdrucks sowie eine verminderte Antwort der Nieren auf Aldosteron und Vasopressin nachgewiesen (Wall et al., 2006). Hohe Renin-Level bei diesen Mäusen deuten außerdem darauf hin, dass NKCC1 normalerweise die Reninfreisetzung aus den juxtaglomerulären Zellen supprimiert (Castrop et al., 2005). Im Umkehrschluss scheint eine pathologisch erhöhte

Aktivität von NKCC1 durch Steigerung des Tonus glatter Muskelzellen und/oder durch Beeinflussung des Hormonhaushaltes zur Entstehung einer Hypertonie beizutragen (Orlov et al., 1999).

1.3.2 NKCC2

Die Transportprozesse, die im dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife (= Thick ascending limb = TAL) stattfinden, sind von grundlegender Bedeutung für die Salz- und Wasserregulation an der Niere und damit auch für die Blutdruckhomöostase. Ein zentrales Element für die Funktion des TAL ist der Ionentransporter NKCC2, der in der apikalen Membran der TAL-Epithelzellen (Kaplan et al., 1996) sowie in der Macula densa (Nielsen et al., 1998) exprimiert wird. NKCC2 reabsorbiert im TAL Natrium im Zusammenspiel mit ROMK und CLCKB und leistet einen Beitrag von 20-25% zur gesamten Natriumreabsorption des Körpers (O'Shaughnessy and Karet, 2006). Es existieren drei verschiedene NKCC2-Isoformen (F, A und B), die sich hinsichtlich ihrer Transkriptionslevel, ihrer Lokalisation und ihrer Ionenaffinität unterscheiden (Castrop and Schnermann, 2008). Die Aktivierung von NKCC2 erfolgt durch Phosphorylierung N-terminaler Threonine (Gimenez and Forbush, 2003, 2005) unter Beteiligung von SPAK/OSR1 (Moriguchi et al., 2005) und wird unter anderem durch Vasopressin (Ortiz, 2006), Noradrenalin (Sonalker and Jackson, 2007) und hohe Flussraten (Hong and Garvin, 2007) stimuliert. Entsprechend der Lokalisation in der Macula densa spielt NKCC2 zudem eine entscheidende Rolle beim tubuloglomerulären Feedback (Castrop, 2007). Pharmakologisch bildet NKCC2 den Angriffspunkt für die sehr potenten Schleifendiuretika (z.B. Furosemid), die beispielsweise zur Therapie akuter Ödeme bei Herz-, Nieren oder Leberinsuffizienz eingesetzt werden. Fehlende Funktion des NKCC2 resultiert, wie in KO-Mäusen gezeigt werden konnte, in massivem Salzverlust und Polyurie (Takahashi et al., 2000). Analog dazu ist beim humanen Patienten das sogenannte Bartter Syndrom Typ I bekannt, eine Erbkrankheit, der loss-of-function-Mutationen des NKCC2 zugrunde liegen und die durch das Auftreten einer Hypotonie einhergehend mit Salzverlust, Polyurie, Hypokaliämie und metabolischer Alkalose gekennzeichnet ist (Flatman, 2008)

1.3.3 NCC

Der Thiazid-sensitive Natrium-Chlorid-Symporter (NCC) wird ausschließlich im DCT exprimiert und trägt etwa 5-10% zur gesamten an der Niere stattfindenden Salzreabsorption bei (O'Shaughnessy and Karet, 2006). Aldosteron (Chiga et al., 2008; Rozansky et al., 2009), AngiotensinII (San-Cristobal et al., 2009; van der Lubbe et al., 2011) und Vasopressin (Pedersen et al., 2010) sind wichtige Modulatoren der NCC-Expression. Bei Funktionsverlust des NCC tritt beim Menschen das sogenannte Gitelman-Syndrom auf, das typischerweise mit Hypotonie, Hypokaliämie, metabolischer Alkalose, Hypokalziurie und Hypomagnesiämie einhergeht (Simon et al., 1996b)

1.3.4 KCC

Bei Säugetieren kommen vier verschiedene Isoformen des Kalium-Chlorid Cotransporters (KCC) vor, die sich unter anderem hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung und ihrer physiologischen Rolle unterscheiden (Adragna et al., 2004b). KCC1 wird ubiquitär exprimiert und trägt zur Regulation des Zellvolumenstatus bei. KCC2 hingegen wird ausschließlich in Neuronen exprimiert und ist essentiell beteiligt an der Steuerung der intrazellulären Cl-Konzentration. KCC3 und 4 werden in diversen Organen inklusive Niere und ZNS exprimiert. Zu den physiologischen Funktionen zählen unter anderem Blutdruck-Regulation durch Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen (Adragna et al., 2004a), transepithelialer Ammonium-Transport (Amlal et al., 1994) und renale Kaliumsekretion (Ellison et al., 1985). Die Regulation von KCCs und NKCCs steht in engem Zusammenhang, da Bedingungen, die zur Aktivierung von KCCs führen (wie beispielsweise Zellschwellung oder hohe intrazelluläre Chloridkonzentrationen), gleichzeitig NKCCs hemmen (Gamba, 2005).

1.3.5 ROMK

ROMK (Renal Outer Medullary Potassium (K) channel) wird in der apikalen Membran der Zellen von TAL, DCT, CNT und CD exprimiert (Xu et al., 1997) und reguliert entscheidend die Kalium-Ausscheidung im Urin und somit die Kalium-Homöostase. ROMK spielt eine wichtige Rolle bei der Urinkonzentrierung, da der Kaliumtransport im TAL den elektrochemischen Gradienten beeinflusst, der den Natriumtransport antreibt. Im Detail bedeutet das, dass das im TAL stattfindende Kaliumrecycling erforderlich ist, um NKCC2

funktionsfähig zu halten. Die Expression von ROMK wird beispielsweise durch Vasopressin stimuliert (Ecelbarger et al., 2001).

1.3.6 ENaC

Der epitheliale Natrium-Kanal (ENaC) setzt sich aus drei Untereinheiten (α , β und γ) zusammen und wird im Verbindungstubulus und Teilen des Sammelrohrs (initial collecting tubule, cortical collecting duct) exprimiert (Hager et al., 2001). ENaC stellt einen wichtigen Effektor des RAAS dar (Sun et al., 2011). Die ENaC-Expression kann beispielsweise durch Aldosteron und Vasopressin stimuliert werden (Ecelbarger et al., 2000), wohingegen das Diuretikum Amilorid die ENaC-Funktion blockiert. Eine spezielle Form der arteriellen Hypertonie beim Menschen, das Liddle Syndrom, wird durch hereditäre gain-of-function-Mutationen der β - und γ -Untereinheit von ENaC verursacht (Hansson et al., 1995; Shimkets et al., 1994).

1.4 Wichtige Hormone der Regulation von Blutdruck und Nierenfunktion

1.4.1 RAAS

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist ein wichtiges Stellglied bei der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes und damit auch des Blutdruckes. Bei einem Abfall des systemischen Blutdruckes oder einer verminderten distal-tubulären NaCl-Konzentration wird aus den juxtaglomerulären Zellen die Protease Renin freigesetzt, die die Bildung des Hormons Angiotensin II (AngII) steuert. AngII wirkt durch lokale sowie systemische Mechanismen, für die spezifische Rezeptoren (AT₁-, AT₂-Rezeptor) existieren, antinatriuretisch (Ardaillou, 1999; Unger et al., 1996). An der Niere werden die physiologischen Effekte von AngII vor allem über den AT₁-Rezeptor vermittelt. Zu den AngII-abhängigen Effekten, die direkt das Tubulussystem betreffen, gehören die Aktivierung von Na-H-Austauschern an der apikalen Membran sowie von Na-Bicarbonat-Transportern und der Na-K-ATPase auf basolateraler Seite (Timmermans et al., 1993). Darüber hinaus ist Angiotensin II ein potenter Vasokonstriktor und moduliert zudem die Freisetzung des Steroidhormons Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Aldosteron steuert an der Niere beispielsweise die Expression des epithelialen Natrium-Kanals (ENaC) über SGK1-abhängige Signalwege. Aldosteron steigert die ENaC-Neusynthese sowie den Einbau präformierter Kanäle in die apikale Zellmembran

von Epithelzellen in Verbindungstübubulus und kortikalem Sammelrohr (Sun et al., 2011). Alle genannten Effekte führen zu einer gesteigerten Rückresorption von NaCl und Wasser an der Niere und damit letztlich zu einem Anstieg des Blutdrucks. (Engelhardt und Breves, 2005; Klinke und Silbernagl, 2001)

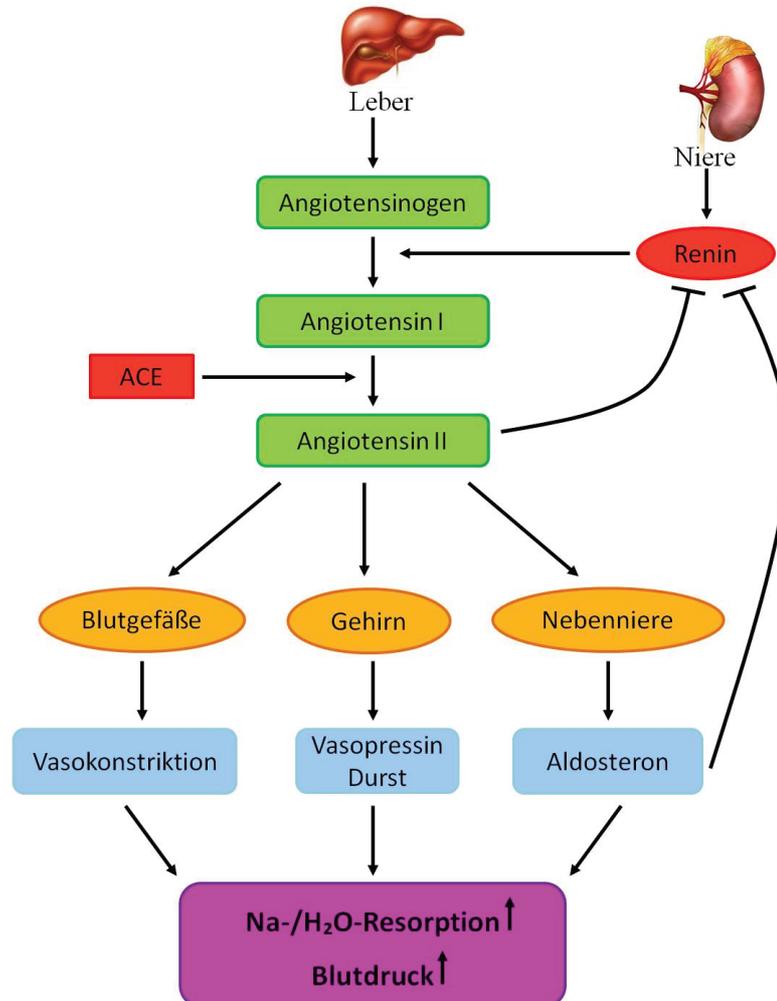


Abb. 2 Schema des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

1.4.2 Vasopressin

Vasopressin (= antidiuretisches Hormon = ADH) wird im Hypothalamus gebildet und im Hypophysenhinterlappen gespeichert. Die ADH-Freisetzung wird unter anderem stimuliert durch einen Anstieg der Serumosmolarität oder durch Volumenmangel im arteriellen System. Vasopressin erhöht die Wasserpermeabilität der distalen Tubulusabschnitte durch Einbau von Aquaporinen (AQP2) und Harnstofftransportern (UT-A1, UT-A3) in die Zellmembran. Dadurch wird die Wasserreabsorption in der Niere gesteigert. Zudem wirkt Vasopressin in hohen Konzentrationen (z.B. bei hypovolämischem Schock) vasokonstriktorisch (Engelhardt und Breves, 2005; Klinke und Silbernagl, 2001).

2. WNK-Kinasen

2.1 Die Familie der WNK-Kinasen und ihre Funktion in der Niere

WNK-Kinasen sind Serin-Threonin-Protein-Kinasen, deren spezifisches Merkmal die Substitution eines Lysin-Restes durch Cystein in der Untereinheit II der katalytischen Domäne ist. Die Funktion der ATP-Interaktion wird hierbei von einem benachbarten Lysin-Rest aus Untereinheit I übernommen. Aufgrund dieser Besonderheit werden diese Kinasen als WNK-Kinasen (= with no K (= Lysin)) bezeichnet (Kahle et al., 2008; Verissimo and Jordan, 2001). Das erste Mitglied dieser Familie, die WNK1-Kinase, wurde im Jahr 2000 beschrieben (Xu et al., 2000). Bei Säugetieren sind bislang insgesamt vier Vertreter der WNK-Kinasen (WNK1-4) bekannt. Darüber hinaus wurden WNK-Kinasen bei anderen Spezies wie z.B. *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* oder *Xenopus sp.* identifiziert. WNK1, 2, 3 und 4 weisen vor allem im Bereich der katalytischen Domäne einen hohen Grad an Homologie auf. Unterschiede finden sich hingegen bezüglich der chromosomalen Lokalisation und der gewebespezifischen Expression der vier WNK-Kinasen (Verissimo and Jordan, 2001). Grundsätzlich fungieren WNK-Kinasen als „molekulare Schalter“ und beeinflussen Ionenkanäle und zelluläre Transporter, die zur Aufrechterhaltung der Flüssigkeits- und Elektrolythomöostase beitragen. Demzufolge werden sie in allen Geweben exprimiert, in denen derartige Transportprozesse stattfinden (z.B. Herz, Muskulatur, Niere, Gehirn, Pankreas...) und werden hier durch Veränderungen der extrazellulären Tonizität aktiviert (Verissimo and Jordan, 2001). Hypertonizität führte in *in-vitro*-Experimenten beispielsweise zu einem Anstieg der Expression von WNK1 und zu Veränderungen der intrazellulären Lokalisation von WNK1 und 4 (Shaharabany et al., 2008; Zagorska et al., 2007).

In der Niere regulieren drei Vertreter der WNK-Kinasen die Aktivität von Ionttransportern, nämlich WNK1, WNK3 und WNK4. Dabei beschränkt sich die Expression von WNK1 und WNK4 auf den distalen Tubulus und das Sammelrohr, wohingegen WNK3 im gesamten Nephron nachgewiesen werden konnte mit Expressionsmaxima im proximalen Tubulus und im TAL (Hoorn et al., 2011; McCormick and Ellison, 2011; Rinehart et al., 2005). Die Koloalisation mit Ionttransportern entlang des Nephrons gibt bereits erste Hinweise auf die regulatorischen Funktionen der WNK-Kinasen.

Nephronabschnitt	WNK-Kinasen	Ionenkanäle	Intermediärkinasen
TAL	FL-WNK1 WNK3	NKCC2 ROMK	SPAK OSR1
DCT/ CNT	FL-WNK1 KS-WNK1 WNK3 WNK4	NCC ENaC ROMK	SPAK OSR1 SGK1
CD	FL-WNK1 WNK3 WNK4	ENaC ROMK	SGK1

Tab. 2 Lokalisation der WNK-Kinasen in der Niere und Kolo­kalisation mit wichtigen Intermediärkinasen und Ionentransportern (modifiziert nach Hoorn et al., 2011)

2.2 Gemeinsame Strukturmerkmale der WNK-Kinasen

Allen vier Vertretern der Familie der WNK-Kinasen sind grundlegende Strukturmerkmale gemeinsam. Zu den konservierten Domänen gehören die Kinase-Domäne, eine autoinhibitorische Domäne, zwei Coiled-Coil-Domänen (= "Doppelwendel"), die eine wichtige Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen spielen, sowie eine kurze Domäne, die durch das gehäufte Auftreten saurer Aminosäuren gekennzeichnet ist und möglicherweise an der Pathogenese des Pseudohypoaldosteronismus Typ II beteiligt sein könnte (Kahle et al., 2006; McCormick and Ellison, 2011). Die vier WNK-Kinasen weisen bezüglich der hochkonservierten Kinasedomäne, bei der sich in Untereinheit II das namensgebende Merkmal des durch Cystein substituierten Lysin-Restes findet, eine hohe Sequenzhomologie von etwa 90% auf (McCormick and Ellison, 2011).

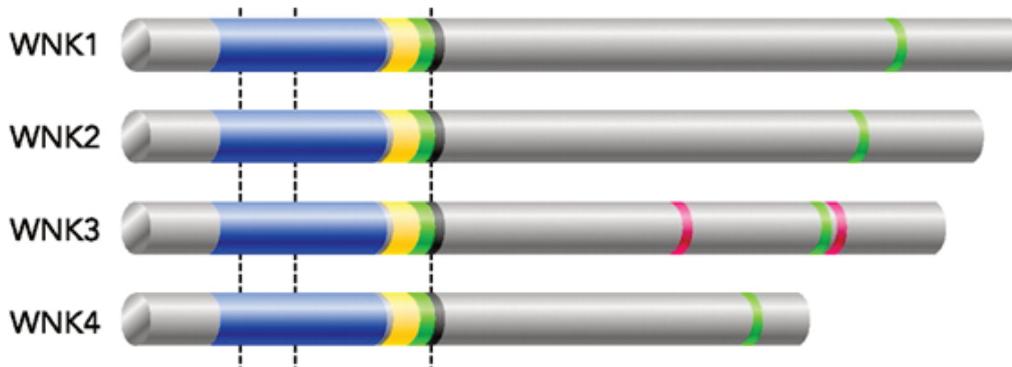


Abb. 3 Gemeinsame Strukturmerkmale der WNK-Kinasen: Kinase-Domäne (blau), autoinhibitorische Domäne (gelb), Coiled-coil-Domänen (grün), Domäne mit sauren Aminosäuren (schwarz) (Kahle et al., 2006)

2.3 WNK-Kinasen: Expression und Isoformen

2.3.1 WNK1

Das humane WNK1-Gen umfasst 28 Exons (160 kb) (Wilson et al., 2001). Beim Menschen und der Maus wurde neben diesem langen Transkript ein verkürztes nierenspezifisches Transkript nachgewiesen (KS-WNK1) (Xu et al., 2002), das mit dem spezifischen Exon 4a beginnt und ab Exon 5 identisch ist mit der langen Isoform (FL-WNK1). KS-WNK1 wird ausschließlich im DCT exprimiert (Delaloy et al., 2003; O'Reilly et al., 2003). Durch alternatives Spleißen der Exons 9, 11 und 12 treten in verschiedenen weiteren Organen Varianten der WNK1-Kinase auf, deren funktionelle Relevanz noch weitgehend unbekannt ist (Delaloy et al., 2003; O'Reilly et al., 2003; Xu et al., 2002). WNK1 wird in vielen Organen exprimiert, wobei die höchsten Expressionslevel in Herz, Niere, Skelettmuskel und Hoden nachgewiesen wurden, während die Expression im Gehirn deutlich geringer ist (O'Reilly et al., 2003). An Chlorid-transportierenden Epithelien findet sich ein gewebespezifisch unterschiedliches Verteilungsmuster in der Zelle: In Niere, Kolon und Gallenblase ist die WNK1-Kinase im Zytoplasma lokalisiert, in der Leber und im Pankreas hingegen in erster Linie an der lateralen Zellmembran (Choate et al., 2003).

2.3.2 WNK2

Beim Menschen besteht das WNK2-Gen aus 30 Exons und 136 kb (Hong et al., 2007). Eine verkürzte WNK2-Isoform wurde als Tumor-Epitop identifiziert (Ito et al., 2001), über weitere Varianten ist bislang wenig bekannt. Die WNK2-Kinase wird in Herz, Gehirn und Kolon exprimiert (Verissimo and Jordan, 2001).

2.3.3 WNK3

Das WNK3-Gen (beim Menschen bestehend aus 24 Exons bzw. 165 kb) ist auf dem X-Chromosom lokalisiert (Holden et al., 2004). Nahezu in allen Organen konnten WNK3-Transkripte nachgewiesen werden, wobei alternatives Spleißen hauptsächlich die Exons 18 und 22 betrifft. In Niere, Gehirn, Lunge, Pankreas und Leber wurde beispielsweise eine WNK3-Isoform identifiziert, welche ein verkürztes Exon 18 (= Exon18a) enthält, während im Gehirn eine längere Isoform (Exon 18a+b) detektiert wurde. Exon 22 wird bei der Maus zwar im Gehirn, nicht jedoch in der Niere exprimiert (Glover et al., 2009).

2.3.4 WNK4

Im Vergleich mit den anderen WNK-Kinasen ist das humane WNK4-Gen eher klein (19 Exons, 16 kb), weist jedoch ähnliche Strukturmerkmale auf (McCormick and Ellison, 2011). WNK4 wird beispielsweise in Kolon und Haut exprimiert (Verissimo and Jordan, 2001).

2.4 Wichtige Intermediärkinasen bei WNK-abhängigen Signalwegen

2.4.1 SPAK/ OSR1

Alle drei in der Niere vorkommenden WNK-Kinasen (WNK1, 3, 4) sind in der Lage, die bei der Signaltransduktion stromabwärts gelegenen Serin-Threonin-Kinasen SPAK (STE20/SPS1-related Pro/Ala-rich kinase) und OSR1 (oxidative stress responsive 1) zu phosphorylieren, die zum Beispiel an der Regulation von Ionenhomöostase und Zellvolumenkontrolle beteiligt sind (Delpire and Gagnon, 2008). Die Aktivierung von SPAK/OSR1 durch die WNK-Kinasen wird ausgelöst durch osmotischen Stress und erfolgt via Phosphorylierung N-terminaler Aminosäurereste (Ponce-Coria et al., 2008; Vitari et al., 2005). Über den SPAK/OSR1 Signalweg werden, wie in Zellkulturexperimenten unter hyperosmotischen bzw. hypotonen Bedingungen nachgewiesen wurde, in der Folge renale Ionentransporter wie NCC, KCC, NKCC1 und NKCC2 durch Phosphorylierungsprozesse aktiviert (Moriguchi et al., 2005; Ponce-Coria et al., 2008; Richardson et al., 2008).

Auch *in vivo* fungiert die SPAK/OSR1-Signalkaskade als wichtiger Regulator renaler Ionentransporter. So zeigen beispielsweise SPAK-KO-Mäuse einen Phänotyp, der mit dem Gitelman-Syndrom des Menschen vergleichbar ist, und weisen demzufolge eine verminderte Expression und Phosphorylierung von NCC

auf. Darüber hinaus ist bei diesen Mäusen im Vergleich zum Wildtyp die Vasokonstriktion aufgrund der fehlenden Phosphorylierung von NKCC1 in glatten Muskelzellen reduziert (Yang et al., 2010).

2.4.2 SGK1

Eine weitere Intermediärkinase, mit der die WNK-Kinasen interagieren, ist die Serum-und-Glucocorticoid-induzierbare-Serin-Threonin-Proteinkinase-1 (SGK1) (Chen et al., 1999). SGK1 spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Aldosteron-abhängigen Effekten und ist demzufolge im aldosteronsensitiven distalen Nephron lokalisiert (Lang et al., 2006). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass beispielsweise die WNK1- und die WNK4-Kinase durch SGK1 phosphoryliert werden können (Ring et al., 2007b; Xu et al., 2005). Da SGK1 die WNK4-vermittelte Hemmung von NCC zu antagonisieren scheint, könnte dieser Signalweg eine Rolle bei der Aldosteron-abhängigen Stimulation der NCC-Aktivität spielen (McCormick and Ellison, 2011).

2.4.3 PI3-Kinase

Die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) ist an der Signaltransduktion diverser zellulärer Schlüsselfunktionen wie Zellwachstum oder Zellproliferation beteiligt. Die PI3-Kinase phosphoryliert Phosphatidyl-Inositol und führt dadurch zur Generierung des second messengers Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Trisphosphat. In der Folge kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung weiterer Kinasen, von denen besonders die Proteinkinase B (= Akt-Kinase) eine zentrale Rolle spielt (Cantley, 2002). WNK1 und WNK4 stellen potentielle Substrate für diesen Signalweg dar, da diese beiden Kinasen Sequenzen besitzen, die für die Interaktion mit Akt1 geeignet erscheinen (Vitari et al., 2005).

2.5 Regulation von Ionenkanälen durch WNK-Kinasen *in vitro*

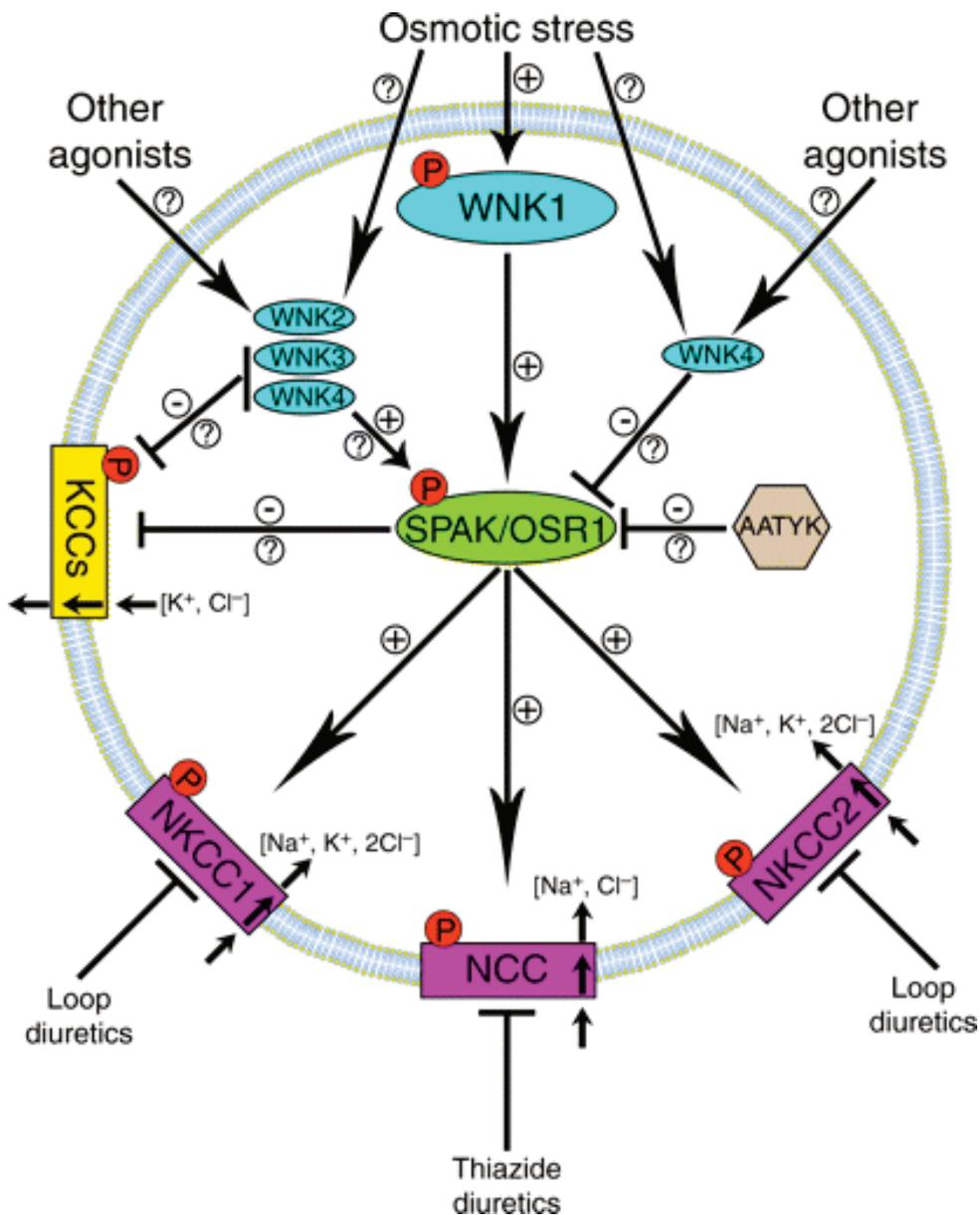


Abb. 4 Schema der wichtigsten bislang bekannten Effekte von WNK-Kinasen auf Ionentransporter (Richardson and Alessi, 2008)

2.5.1 WNKs und NKCC1

NKCC1 wird im Allgemeinen unter hypotonen Bedingungen stark gehemmt. Dementsprechend konnte bei Experimenten in *Xenopus*-Oozyten gezeigt werden, dass WNK4 *in vitro* in hypotonem Milieu zu einer NKCC1-Inhibition führt (Kahle et al., 2004). In einer neueren Studie hingegen kam es bei Coexpression von NKCC1 mit SPAK und WNK4 unter isotonen Bedingungen zu einer Aktivierung von NKCC1 (Gagnon et al., 2006; Gagnon et al., 2007b). Für diese Aktivierung waren katalytisch aktive Formen beider Kinasen erforderlich, wobei

WNK4 NKCC1 nicht direkt, sondern über die bei der Signaltransduktion nachgeschaltete SPAK-Kinase zu beeinflussen scheint (Gagnon et al., 2006). Dies könnte auch die konträren Befunde bei isolierter Expression von WNK4 und NKCC1 erklären.

2.5.2 WNKs und NKCC2

NKCC2 wird im Gegensatz zu NKCC1 unter hypotonen (Cl-armen) Bedingungen vermehrt phosphoryliert und aktiviert. Coexpression von NKCC2 mit WNK3 in *Xenopus*-Oozyten resultiert in einer gesteigerten Phosphorylierung von NKCC2 an den amino-terminalen Threoninen Thr-96 und Thr-101 und führt damit zur Aktivierung von NKCC2, wie anhand der signifikanten Steigerung des Kalium-Uptakes, der mittels eines radioaktiven Markers detektiert wurde, nachgewiesen werden konnte. Dieser Effekt wird durch zusätzliche Expression der SPAK-Kinase, für die WNK3 ein spezifisches Bindungsmotiv in der carboxy-terminalen Domäne besitzt, verstärkt. Die kinase-inaktiven Varianten von WNK3 und SPAK hingegen reduzieren die NKCC2-Aktivität. WNK3 liegt bei dieser Signalkaskade stromaufwärts von SPAK und steuert als chloridsensitive Kinase die Aktivität von NKCC2 in Abhängigkeit von der intrazellulären Chlorid-Konzentration (Ponce-Coria et al., 2008). Neben der spezifischen Transporteraktivität steigert die WNK3-Kinase auch die Oberflächenexpression von NKCC2 durch vermehrte Translokation zur apikalen Zellmembran (Rinehart et al., 2005) und spielt zudem durch Phosphorylierung der N-terminalen Threonine Thr-184 und Thr-189 eine zentrale Rolle bei der Vasopressin-vermittelten Aktivierung von NKCC2 (Gimenez and Forbush, 2003). WNK3 und SPAK steuern also offensichtlich durch dynamische Änderung des Gleichgewichts von katalytisch aktiven und inaktiven Kinase-Formen die NKCC2-Aktivität in Abhängigkeit von der intrazellulären Chloridkonzentration. Neben WNK3 sind auch die beiden anderen in der Niere exprimierten WNK-Kinasen WNK1 und 4 an der Regulation von NKCC2 beteiligt. Während FL-WNK1 und WNK4 analog zu WNK3 die NKCC2-Aktivität und die Translokation zur apikalen Zellmembran über die SPAK/OSR1-Signalkaskade steigern (Huang et al., 2008; Moriguchi et al., 2005; Richardson et al.; Vitari et al., 2005), hemmt KS-WNK1 die Aktivität von NKCC2. Dieser inhibierende Mechanismus könnte indirekt durch eine dominant-negative Wirkung von KS-WNK1 auf L-WNK1 vermittelt werden (Liu et al., 2011).

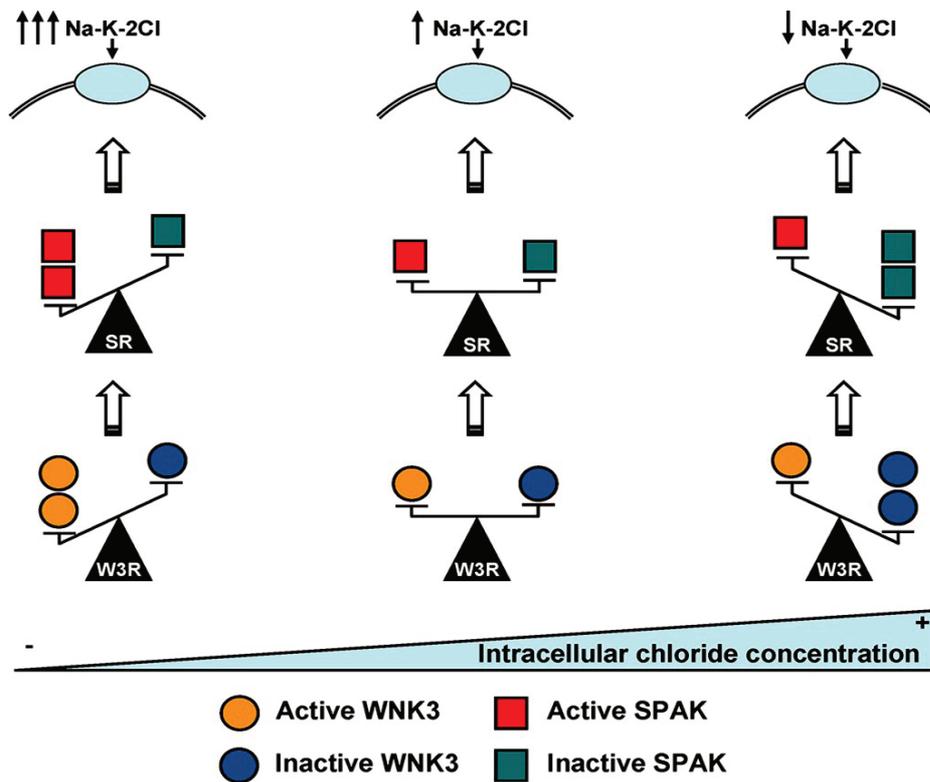


Abb. 5 Regulation von NKCC2 durch WNK3 und SPAK in Abhängigkeit von der intrazellulären Chloridkonzentration (Ponce-Coria et al., 2008)

2.5.3 WNKs und NCC

In Experimenten an Xenopus-Oozyten und HEK-Zellen konnte ein inhibitorischer Effekt von WNK4 auf NCC nachgewiesen werden, wobei WNK4 die Oberflächenexpression von NCC reduziert und schließlich zu einer lysosomalen Degradierung von NCC führt (Cai et al., 2006; Golbang et al., 2006; Subramanya et al., 2009; Yang et al., 2003). WNK3 hingegen fungiert *in vitro* als Aktivator von NCC und tritt in Interaktion mit WNK4, um eine dynamische Regulation des NCC zu ermöglichen (Rinehart et al., 2005; Yang et al., 2007b). Interessanterweise entfaltet eine Kinase-inaktive WNK3-Form eine genau gegensätzliche, also inhibierende Wirkung (Rinehart, Kahle et al. 2005; Yang, Zhu et al. 2007). Der Gesamteffekt auf NCC wird also vermutlich wesentlich durch den Antagonismus zwischen WNK3 und WNK4 beeinflusst (Hoorn et al., 2011). Darüber hinaus konnte im Gegensatz zur renalen Isoform für die gehirnspezifische Isoform von WNK3 eine inhibierende Wirkung auf NCC nachgewiesen werden (Glover et al., 2009). Die WNK1-Kinase stimuliert wie WNK3 die NCC-Aktivität über den SPAK/OSR1-Signalweg und führt zur Phosphorylierung N-terminaler Aminosäurereste (Moriguchi et al., 2005; Vitari et al., 2005). Zudem stellt WNK1 durch Hemmung der WNK4-Kinase einen

indirekten Aktivator für NCC dar (Yang et al., 2003). Analog zu den bei NKCC2 beschriebenen Mechanismen, scheint auch bei NCC der nierenspezifischen Isoform von WNK1 eine indirekte regulatorische Funktion durch inhibierende Effekte auf das lange WNK1-Transkript zuzukommen (Liu et al., 2011).

Auch verschiedene Hormone spielen bei den genannten Regulationsprozessen eine Rolle. Dazu zählen Aldosteron (Chiga et al., 2008; Rozansky et al., 2009), Angiotensin II (San-Cristobal et al., 2009; van der Lubbe et al., 2011) und Vasopressin (Pedersen et al., 2010). SPAK/OSR1 sowie SGK1 sind als Intermediärkinasen in die Aktivierung von NCC durch WNK-Kinasen involviert (Chiga et al., 2008; Rozansky et al., 2009; San-Cristobal et al., 2009; van der Lubbe et al., 2011).

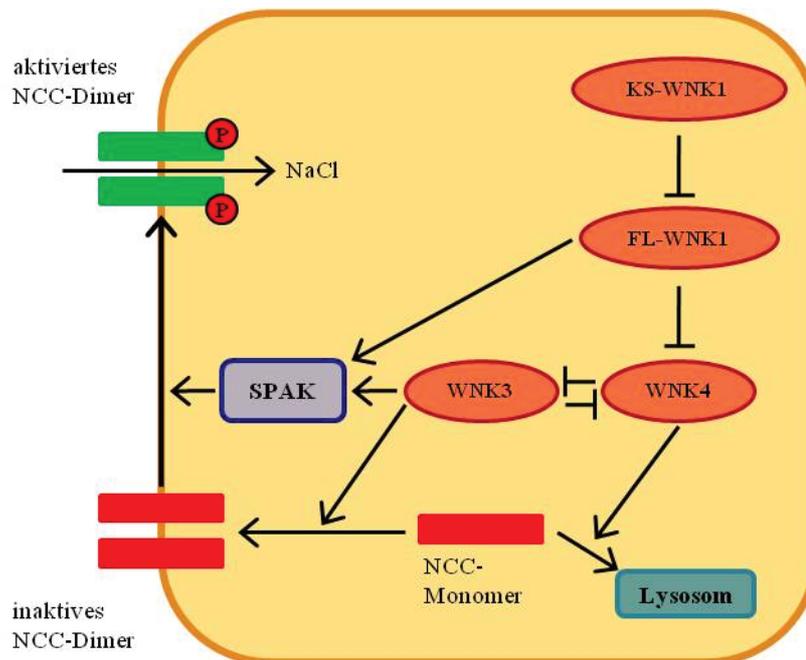


Abb. 6 Regulation von NCC durch WNK-Kinasen (modifiziert nach Hoorn et al., 2011)

2.5.4 WNKs und KCC

Alle drei in der Niere vorkommenden WNK-Kinasen wirken *in vitro* unter hypotonen Bedingungen inhibierend auf die KCC-Funktion (de Los Heros et al., 2006). Hierbei sind wahrscheinlich sowohl SPAK-abhängige (Gagnon et al., 2006) als auch SPAK-unabhängige Signalwege beteiligt.

2.5.5 WNKs und ROMK

WNK4 hemmt die ROMK1-Aktivität *in vitro* durch Reduktion der Expression an der Plasmamembran (Kahle et al., 2003). Auch FL-WNK1 hemmt ROMK1 durch Steigerung der Endozytose von ROMK1 (Fang et al., 2009). KS-WNK1 hingegen

wirkt indirekt aktivierend auf ROMK durch Antagonisierung der Effekte von FL-WNK1 (Liu et al., 2009). WNK3 hemmt ROMK wie WNK4 und FL-WNK1 bei Experimenten in *Xenopus*-Oozyten durch Reduktion der Oberflächenexpression (Leng et al., 2006).

2.5.6 WNKs und ENaC

Sowohl FL-WNK1 als auch KS-WNK1 scheinen *in vitro* die ENaC-Aktivität über einen SPAK/OSR1-unabhängigen Signalweg zu steigern. Für FL-WNK1 konnte eine Beteiligung der Phosphatidylinositol-3-Kinase bei der ENaC-Aktivierung nachgewiesen werden (Naray-Fejes-Toth et al., 2004; Xu et al., 2005). WNK4 wirkt wie bei NCC antagonistisch zu WNK1 und hemmt ENaC (Ring et al., 2007a). Für die WNK3 Kinase konnte in *in-vitro*-Experimenten bislang kein Effekt auf ENaC nachgewiesen werden (Leng et al., 2006).

2.5.7 WNKs und TRP Kanäle

TRP-Kanäle (= Transient receptor potential) sind Kationenkanäle, die an diversen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind und in sechs Unterfamilien gegliedert werden können: TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPML, TRPP. Die Aktivität der TRP-Kanäle wird unter anderem gesteuert durch Tonizität, Temperatur und verschiedene Hormone. Dysfunktionen von TRP-Kanälen wurden beispielsweise bei Nierenkrankheiten (Woudenberg-Vrenken et al., 2009) und kardiovaskulären Erkrankungen (Inoue et al., 2009) identifiziert. *In vitro* Studien deuten darauf hin, dass WNK Kinasen an der Regulation der TRP-Kanäle beteiligt sind. WNK1 und 4 reduzieren *in vitro* beispielsweise die Oberflächenexpression des TRPV4-Kanals (Fu et al., 2006), der an der Ca-Reabsorption in der Niere beteiligt ist und eine wichtige Rolle bei der Wasserhomöostase spielt (Liedtke and Friedman, 2003). TRPV5 ist wie TRPV4 in hohem Maße an der Ca-Homöostase beteiligt (Hoenderop et al., 2003). WNK4 stimuliert TRPV5 in *Xenopus*-Oozyten und erhöht die Oberflächenexpression (Jiang et al., 2007). Auch WNK3 beeinflusst in *Xenopus*-Oozyten den Ca-Transport durch Steigerung der Oberflächenexpression von TRPV5 und 6 (Zhang et al., 2008).

2.6 Physiologische Rolle von WNK-Kinasen: *in-vivo*-Daten

WNK-Kinasen sind an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt, die essentiell sind für Wachstum und Entwicklung, Blutdruckregulation, Wasser- und

Elektrolythomöostase sowie sensorische Funktionen. Bisher ist insgesamt nur sehr wenig über die physiologischen Mechanismen bekannt, über die WNK-Kinasen diese Prozesse steuern. Funktionelle Daten gibt es bislang nur zu den WNK-Kinasen 1 und 4.

Mausmodell	Phänotyp	Referenz
Modelle mit Hypotonie		
NKCC2 -/-	Bartter-ähnlich	(Takahashi et al., 2000)
SORLA -/-	Bartter-ähnlich	(Reiche et al., 2010)
NCC-/-	Gitelman-ähnlich	(Schultheis et al., 1998)
WNK4-/-	Gitelman-ähnlich	(Castaneda-Bueno et al., 2012)
WNK4 ^{WT} transgen	Gitelman-ähnlich	(Lalioti et al., 2006)
WNK4 „hypomorph“	Gitelman-ähnlich	(Ohta et al., 2009)
WNK1 heterozygot	Hypotonie	(Zambrowicz et al., 2003)
SPAK-/-	Gitelman-ähnlich	(Yang et al., 2010)
SPAK ^{243A/243A} knock-in	Gitelman-ähnlich	(Rafiqi et al., 2010)
SGK-/-	Hyperkaliämie	(Wulff et al., 2002)
Modelle mit Hypertonie		
WNK4 ^{PHAI} transgen	FHHt-ähnlich	(Lalioti et al., 2006)
WNK4 ^{D561A/+} knock-in	FHHt-ähnlich	(Yang et al., 2007c)
Modelle ohne detektierbaren Phänotyp		
NCC transgen	Kein Phänotyp	(McCormick et al., 2011)
KS-WNK1-/-	Kein Phänotyp	(Hadchouel et al., 2010)
ENaC-/- (CD-spezifisch)	Kein Phänotyp	(Rubera et al., 2003)

Tab. 3 Übersicht über Mausmodelle WNK-assoziierter Proteine (modifiziert nach Hoorn et al., 2011)

2.6.1 WNK1 und NaCl-Transport

In-vivo-Studien über WNK1 sind mit diversen Schwierigkeiten behaftet. So ist beispielsweise eine vollständige Deletion des WNK1-Gens aufgrund kardiovaskulärer Abnormitäten bereits im Embryonalstadium letal (Xie et al., 2009). Die bislang generierten Studien über die Effekte von WNK1 *in vivo* sind hinsichtlich der Ergebnisse inkonsistent. Eine Studie mit WNK1-heterozygoten Mäusen zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine Reduktion des Blutdrucks (Zambrowicz et al., 2003). Über die Auswirkungen der WNK1-Defizienz auf die Regulation von SPAK und NCC und damit über den zugrunde liegenden Mechanismus gibt es bislang keine fundierten Daten. Bei einem anderen Stamm von WNK1-heterozygoten Mäusen konnte kein relevanter Phänotyp detektiert werden, die Arbeitsgruppe postuliert jedoch eine Rolle von WNK1 bei der Regulation von NKCC1 im Gefäßsystem (Susa et al., 2012). Die tatsächliche physiologische Relevanz von WNK1 bedarf also in vielen Bereichen noch einer genaueren Klärung.

Die anhand der *in-vitro*-Daten aufgestellte Hypothese, dass KS-WNK1 antagonistisch zu FL-WNK1 wirkt, konnte in Versuchen mit KS-WNK1-KO-Mäusen bestätigt werden. Diese Mäuse haben stark erhöhte NCC-Expressions-Level, ECF-Volumen-Expansion, reduzierte Aldosteron-Level sowie einen geringgradig erhöhten diastolischen BD (Hadchouel et al., 2010). Bei KS-WNK1-transgenen Mäusen hingegen wurde im Vergleich zum Wildtyp eine verminderte NCC-Expression und ein niedrigerer Blutdruck nachgewiesen. KS-WNK1 fungiert also offensichtlich als endogener, dominant-negativer Regulator von FL-WNK1 und bewirkt dadurch eine Hemmung der NCC Aktivität *in vivo* (Liu et al., 2009).

2.6.2 WNK4 und NaCl-Transport

WNK4-Mutationen spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des Pseudohypoaldosteronismus Typ II (= FHHT), einer autosomal-dominanten Erbkrankheit des Menschen. Betroffene Patienten leiden unter anderem an massivem Kaliumverlust und Osteopenie. Thiazid-Diuretika senken den Blutdruck bei diesen Patienten stärker als es bei gesunden Individuen der Fall ist (Mayan et al., 2002). Demzufolge werden FHHT-Symptome, die auf WNK4 Mutationen beruhen, offensichtlich durch eine übersteigerte Aktivierung von NCC verursacht. Die Tatsache, dass eine WNK4-Überexpression bei Mäusen zu

einer Verminderung des Blutdruckes einhergehend mit einer Hypokaliämie führt, scheint die genannte These zu bestätigen. Außerdem ist bei diesen Mäusen die NCC-Expression im Nierencortex reduziert. WNK4 fungiert also scheinbar tatsächlich als Inhibitor der NCC Aktivität *in vivo* (Lalioti et al., 2006). Die Ergebnisse in diesem Bereich sind jedoch kontrovers, was deutlich zeigt, wie unzureichend die Datenlage bezüglich der Physiologie der WNK-Kinasen derzeit noch ist. So wies eine andere Arbeitsgruppe bei hypomorphen Mäusen (Deletion von Exon 7 und 8 von WNK4) eine verminderte SPAK/OSR1-Phosphorylierung sowie eine geringgradige Reduktion des Blutdruckes nach. Die Gesamtmenge des exprimierten NCC blieb dabei jedoch unverändert. Nach diesen Ergebnissen scheint WNK4 also eher aktivierend auf NCC zu wirken als inhibierend (Ohta et al., 2009). Die genaue physiologische Rolle der WNK4-Kinase *in vivo* ist also noch unklar. Es wird derzeit hypothetisiert, dass WNK4 möglicherweise unter bestimmten Voraussetzungen von einem inhibitorischen in einen stimulatorischen Modus wechseln kann. Einblicke in diese Prozesse gewährt eine aktuelle Studie aus dem Jahr 2012, in der erstmals ein WNK4-KO-Mausmodell beschrieben wurde (Castaneda-Bueno et al., 2012). Die WNK4-KO-Mäuse zeigten einen milden, Gitelman-ähnlichen Phänotyp mit Hypokaliämie, Hypomagnesiämie, metabolischer Alkalose und erhöhten Plasmareninleveln ohne Veränderungen des Blutdruckes. Zudem waren die Oberflächenexpression und die Phosphorylierung von NCC reduziert. Frühere Studien legten bereits den Verdacht auf einen Zusammenhang der Angiotensin II-abhängigen Aktivierung von NCC mit der WNK4-Kinase nahe (San-Cristobal et al., 2009; van der Lubbe et al., 2011). Dies wurde durch den Befund untermauert, dass die WNK4-KO-Mäuse auf Angiotensin II-Gabe im Gegensatz zum Wildtyp nicht mit einer gesteigerten Phosphorylierung von SPAK oder NCC reagierten (Castaneda-Bueno et al., 2012).

2.6.3 WNK1 und K-Transport

In-vitro-Daten lassen vermuten, dass WNK1 den Kaliumtransport in der Niere durch Clathrin-abhängige Reduktion der Expression von ROMK in der apikalen Zellmembran hemmt (He et al., 2007). Bei heterozygoten WNK1-Mäusen zeigten sich keine Auffälligkeiten bezüglich der Serumkaliumkonzentrationen (Zambrowicz et al., 2003). Transgene KS-WNK1-Mäuse hingegen exprimieren gesteigerte ROMK-Level und sind hypokaliämsch (Liu et al., 2009). Insgesamt

scheint also WNK1 eine direkte Rolle bei der K-Homöostase zu spielen, wobei KS-WNK1 wiederum als Inhibitor von FL-WNK1 agiert. Die Datenlage in diesem Bereich ist allerdings noch unvollständig, so gibt es bislang z.B. keine Informationen zur Expression von ROMK in WNK1-KO-Mäusen.

2.6.4 WNK4 und K-Transport

In vitro wirkt WNK4 inhibierend auf ROMK und dieser Effekt verstärkt sich bei bestimmten WNK4-Mutationen. Inwieweit dieser Mechanismus jedoch zum Beispiel an der Hyperkaliämie bei FHHt-Patienten beteiligt ist, wird noch kontrovers diskutiert, da beispielsweise transgene Mäuse, die die bereits in 2.5.2 erwähnte WNK4-Mutation tragen, normale ROMK-Level exprimieren (Lalioti et al., 2006). Zudem ist noch ungeklärt, inwieweit bei FHHt-Patienten die Dysregulation renaler KCC-Transporter zur Entstehung der Hyperkaliämie beiträgt.

2.7 Beteiligung der WNK-Kinasen an pathologischen Prozessen

2.7.1 FHHt

Wie bereits erwähnt, sind vermutlich Mutationen der WNK-Kinasen 1 und 4 (McCormick and Ellison, 2011) an der Entstehung des Pseudohypoaldosteronismus Typ II (= Familial Hypercalemic Hypertension (FHHt)), einer autosomal dominanten Erbkrankheit, beteiligt (Brautbar et al., 1978). Symptomatisch treten bei FHHt neben einer Hypertonie und einer Hyperkaliämie eine metabolische Azidose und eine verminderte Plasma-Renin-Aktivität auf (Wilson et al., 2001). Bezüglich der Pathogenese von FHHt unter Beteiligung von WNK4 gibt es derzeit vier Modelle, die auf den in *in-vitro*- und *in-vivo*-Experimenten beobachteten Effekten von Mutationen der WNK4-Kinase beruhen (vgl. Abbildung 8). Der endgültige Beweis für den zugrunde liegenden Pathomechanismus steht jedoch noch aus. Weder die WNK1-Modelle noch die WNK4-Modelle spiegeln den vollständigen Phänotyp des FHHt des Menschen wieder, d.h. es sind vermutlich multiple Mechanismen involviert (McCormick and Ellison, 2011).

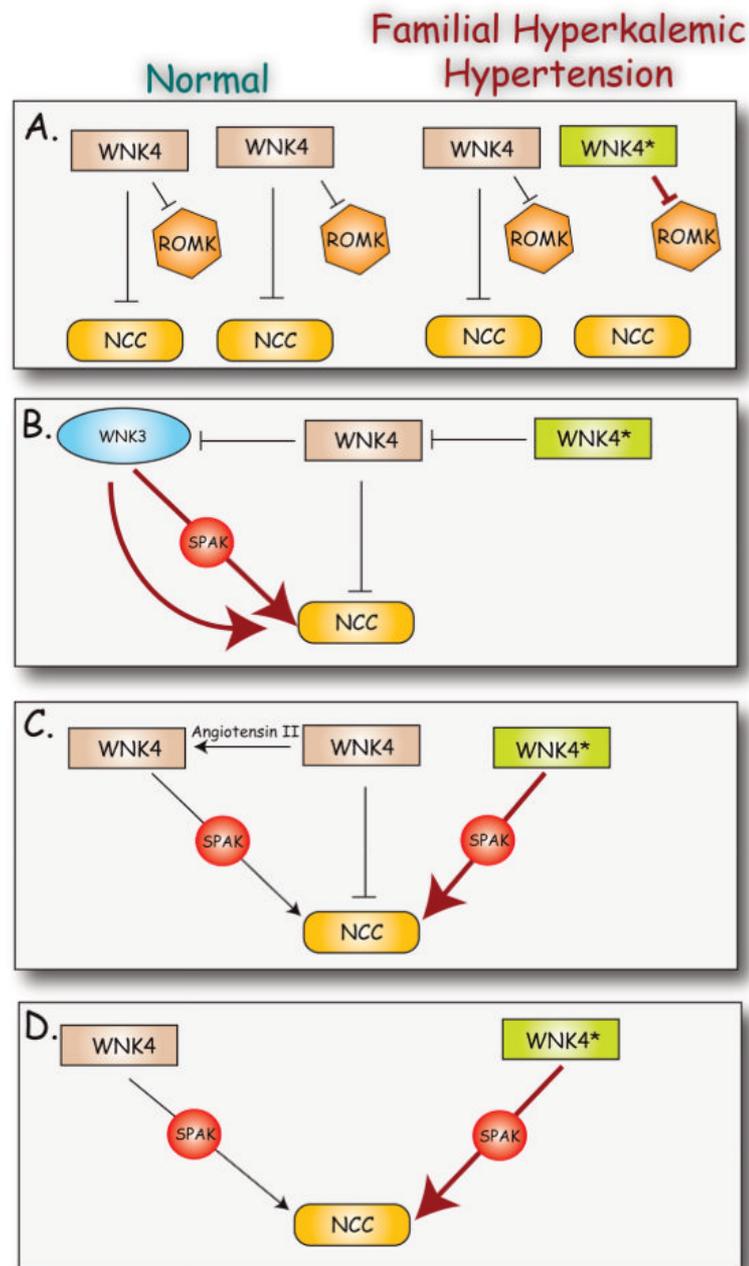


Abb. 7 Modelle der Pathogenese von FHHt (McCormick and Ellison, 2011)

A: Die Mutation von einem der beiden WNK4-Gene führt zu einem Verlust der Fähigkeit, NCC zu hemmen und zugleich zu einer übersteigerten Inhibition von ROMK ((Lalioti et al., 2006).

B: Die WNK4-Mutante ist ein dominant-negativer Inhibitor der Wildtyp-WNK4-Kinase; dadurch kommt es zu einer unzureichenden Hemmung von WNK3 und infolge dessen zu einer NCC-Überaktivierung (Yang et al., 2007b).

C: WNK4 wirkt unter bestimmten Bedingungen aktivierend auf NCC statt inhibierend, z.B. unter dem Einfluss hoher zirkulierender AngII-Level oder durch Mutation (San-Cristobal et al., 2009).

D: WNK4 wirkt bereits basal als Stimulator von NCC; bei FHHt liegt eine gain-of-function Mutation vor (Yang et al., 2007c).

2.7.2 Essentielle Hypertonie

Die essentielle Hypertonie bezeichnet einen chronisch erhöhten Blutdruck ohne definierbare organische Ursache und stellt einen wichtigen Risikofaktor für Folgeerkrankungen wie Schlaganfall, Herzinfarkt oder kongestives Herzversagen dar. Genetische und Umweltfaktoren tragen zur Entstehung der essentiellen Hypertonie bei. In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass WNK-Kinasen den Blutdruck beeinflussen können (Wilson et al., 2001; Zambrowicz et al., 2003). SNPs (=Single Nucleotide Polymorphism) der WNK-Kinasen sind daher interessante Kandidaten im Zusammenhang mit der Pathogenese der essentiellen Hypertonie. Diverse SNPs wurden bei WNK-Kinasen bereits identifiziert, von denen für einige auch ein Zusammenhang mit der Blutdruck-Regulation nachgewiesen werden konnte (Erlich et al., 2003; Kokubo et al., 2004; Newhouse et al., 2009; Newhouse et al., 2005; Osada et al., 2009; Tobin et al., 2005; Turner et al., 2005).

2.7.3 HSANII

Die autosomal-rezessive hereditäre sensorische und autonome Neuropathie (= HSANII) führt durch den hochgradigen Ausfall markhaltiger Nervenfasern langsam progressiv zum Sensibilitätsverlust aller Modalitäten (Shekarabi et al., 2008). Die Mutationen, die HSANII zugrunde liegen, befinden sich wahrscheinlich in Intron 8 von WNK1 (HSN2 = neuartiges Exon) (Riviere et al., 2004). HSN2-Varianten von WNK1 werden durch den KS-Promotor generiert, d.h. es fehlt bei dieser verkürzten WNK1-Form die Kinase-Domäne. Ein potentieller Mechanismus der Pathogenese von HSANII könnte eine Dysregulation der TRP-Kanäle darstellen, die in sensorischen Neuronen exprimiert werden und an der Transduktion chemischer, thermischer und mechanischer Signale beteiligt sind (Bevan and Andersson, 2009). Für eine Beteiligung der WNK-Kinasen an der Regulation der TRP-Kanäle und damit an der Regulation der peripheren Sensorik *in vivo* spricht auch, dass Patienten mit einer bestimmten WNK3-Mutation eine erhöhte Schmerzschwelle haben (Qiao et al., 2008).

2.7.4 Autismus

Neue Studien lassen eine Beteiligung des WNK3-Gens an der Entstehung des Autismus vermuten. Durch Deletionen auf dem X-Chromosom kommt es zur

Expression eines stark verkürzten WNK3-Proteins mit unvollständiger Kinase-Domäne (Qiao et al., 2008). Es ist bereits bekannt, dass WNK3 den Chloridtransport moduliert und somit an der Aufrechterhaltung des intrazellulären Volumens und der Erregbarkeit GABA-gesteuerter Neurone beteiligt ist. Außerdem ist die Expression von WNK3 mit Komponenten des GABA-ergen Systems kolokalisiert (Kahle et al., 2005). Allerdings sind bei der genannten Deletion auf dem X-Chromosom zwei weitere Gene betroffen, so dass die WNK3-Deletion nicht zwangsläufig kausal für den Autismus sein muss.

2.7.5 Krebs

Bei verschiedenen Krebs-Formen konnten in Screening-Studien Punktmutationen von WNK-Kinasen identifiziert werden.

WNK-Kinase	Gewebe bzw. Typ	Referenz
WNK1	Prostata, Mammakarzinom, Ovar	(Moore et al., 2000), (Stephens et al., 2005), (Greenman et al., 2007)
WNK2	Lunge, Ovar, Dickdarm, Magen	(Greenman et al., 2007)
WNK3	Gliom, Lunge, Niere, Magen	(Greenman et al., 2007)
WNK4	Melanom, Ovar	(Greenman et al., 2007)

Tab. 4 Überblick über Krebsarten, an denen Mutationen von WNK-Kinasen beteiligt sein könnten (modifiziert nach McCormick and Ellison, 2011)

2.7.6 Osteoporose

An der Entstehung der Osteoporose ist essentiell das Immunsystem beteiligt (Breuil et al., 2010). Beim Screening von B-Lymphozyten von Frauen in der Postmenopause wurde nachgewiesen, dass die WNK1-Expression bei Patientinnen mit verminderter Knochendichte reduziert ist. Bei diesen Vorgängen spielt vermutlich die Dysregulation eines Östrogen-MAP3K-Netzwerks, an dem WNK1 beteiligt ist, eine Rolle (Xiao et al., 2008).

III. ZIELSETZUNG

Für die WNK-Kinasen 1 und 4 konnte bereits eine Beteiligung an Erbkrankheiten des Menschen nachgewiesen werden, deren Pathogenese weitgehend ungeklärt war und für die es bis dato keine ätiologische Therapie gibt. Über die physiologische Relevanz von WNK2 und WNK3 ist bisher wenig bekannt. Daher ist die Klärung der Funktion von WNK2 und WNK3 für ein umfassenderes Verständnis pathophysiologischer Prozesse und die Etablierung neuer Therapiestrategien von hoher Relevanz. *In-vitro*-Daten aus Experimenten in *Xenopus*-Oozyten lassen vermuten, dass die WNK3-Kinase eine zentrale Rolle bei der Regulation renaler Ionenporter und demzufolge für den Wasser- und Elektrolythaushalt spielen könnte. Über die physiologischen Effekte der WNK3-Kinase und die Bedeutung der WNK3-Kinase für den Ionenport an der Niere *in vivo* ist bislang aufgrund des Fehlens geeigneter Tiermodelle nichts bekannt. Das Ziel dieser Arbeit ist die Analyse des renalen Phänotyps einer WNK3-KO-Maus, um die Bedeutung der WNK3-Kinase für den renalen Ionenport und daraus resultierende Konsequenzen für die Salz-, Wasser- und Blutdruckhomöostase zu evaluieren.

IV. VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

1.1 Generierung, Zucht und Haltung der WNK3-KO-Mäuse

Die Generierung der WNK3-defizienten Maus-Linie erfolgte entsprechend dem Standard-Protokoll für das sogenannte „Gene Trapping“ (zu Deutsch „Genfalle“), wobei durch Integration eines Vektors in das Mausgenom ein Gen „ausgeschaltet“ werden kann und somit seine Funktion verliert. Hierzu wurden Klone embryonaler Maus-Stammzellen (Mausstamm: 129SvEv), bei denen ein Gene-Trap-Vektor in das WNK3-Gen integriert hatte, in Wildtyp-Blastozysten (Mausstamm: C57BL/6) injiziert. Die daraus hervorgehenden chimären Mäuse wurden mit C57BL/6-Wildtyp-Mäusen gekreuzt, um die Übertragung in die Keimbahn zu gewährleisten. Die entsprechenden Schritte zur Generierung der WNK3-KO-Mauslinie wurden von der Firma „Lexicon Pharmaceuticals“ durchgeführt, die Zucht erfolgte an der Universität Regensburg. Die Tierhaltung (Temperatur: $23 \pm 2^\circ\text{C}$, Luftfeuchtigkeit: $55 \pm 5\%$, Hell-Dunkel-Intervall: 12 h, Futter und Wasser ad libitum) und die Durchführung der Experimente erfolgten gemäß den Empfehlungen der FELASA. Für die Versuche wurden ausschließlich adulte Mäuse mit einem Alter von 6-8 Wochen verwendet, wobei das Zuchtmanagement der WNK3-KO-Mäuse so erfolgte, dass jeweils Wurfgeschwister als Wildtyp-Kontrollen zur Verfügung standen.

1.2 Genotypisierung der WNK3-KO-Mäuse

Zur Bestätigung des Genotyps wurden in der vorliegenden Studie bei allen Versuchstieren routinemäßig Genotypisierungen anhand von Schwanzbiopsien durchgeführt. Zur DNA-Extraktion wurden die Gewebeprobe mit 100 μl Direkt-PCR-Lyse-Reagenz und 1 μl Proteinase K über Nacht bei 55°C und danach für 45 min. bei 85°C inkubiert. Im Anschluss wurde eine PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) mit folgenden Primern durchgeführt:

- WT forward: 5'-AGCCCAACCACTACAATTCA-3'
- WT reverse: 5'-GGTAACATGATTTGCTGATCCC-3'
- WNK3-KO forward: 5'-AAATGGCGTTACTTAAGCTAGCTTGC-3'
- WNK3-KO reverse: 5'-TAACATGATTTGCTGATCCCCCTAC-3'

Reaktionsansatz für die PCR	
4 µl	5x Go Taq Buffer
0,4 µl	dNTPs
0,4 µl	Primer forward
0,4 µl	Primer reverse
0,2 µl	5U/µl Tag polymerase
12 µl	dd H ₂ O
1 µl	DNA (1:10 verd.)

Amplifizierungsprotokoll		
Zyklen	Temperatur	Dauer
1	94°C	4 min
10	94°C	15 sec
10	65°C	30 sec
10	72°C	30 sec
30	94°C	15 sec
30	55°C	30 sec
30	72°C	30 sec

Die PCR-Produkte wurden danach auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen, wobei die zu erwartenden Banden der Gelelektrophorese bei 765 bp (Wildtyp) bzw. 371 bp (WNK3-KO) lagen.

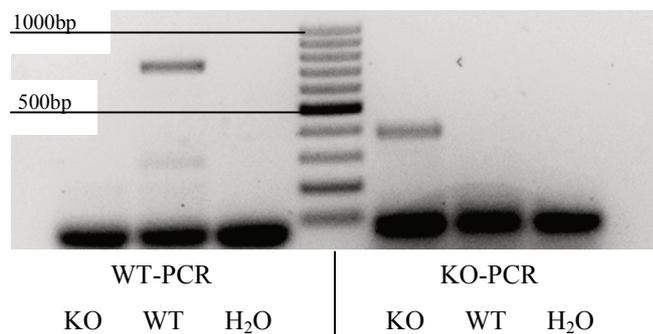


Abb. 8 Beispiel für eine Genotypisierungs-PCR von WNK3-KO-Mäusen (371 bp) und Wildtyp-Mäusen (765 bp)

2. Material

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Blockcycler	Mastercycler, Eppendorf, Hamburg
Brückenverstärker	FE221, ADInstruments, Spechbach
Druckmessfühler	MLT844, ADInstruments, Spechbach
Flammenphotometer	Sherwood Modell 410, Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Flowmeter	T402-PB, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY
Flowprobe	PBS 0,5, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY
Fluoreszenzlampe	X-Cite 120, EXFO Life Sciences & Industrial Division, Mississauga, Canada
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories, München
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen
Isofluran-Verdampfer	Harvard Apparatus GmbH, Holliston, MA
Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Jena
Lightcycler System	Lightcycler LC480, Roche, Mannheim
Maus-OP-Tisch, beheizt	08321, KE Med. Techn. Gerätebau
Maus-Restrainer	Braintree scientific, Braintree, MA
Mikroskope	DMRB, Leica, Wetzlar LSM 5 Exciter, Zeiss, Jena
Mikromanipulator	Leica, Wetzlar
Nanodrop	ND-1000, Peqlab Erlangen ND-3300, Nanodrop Products, Wilmington, DE
Narkosegas-Absorber	Harvard Apparatus GmbH, Holliston, MA
Osmometer	Osmomat 030, Gonotec, Berlin
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin

Gerät	Hersteller
8-Kanal PowerLab	PowerLab 8/35, ADInstruments, Spechbach
Stoffwechselkäfige	MMC100, Hatteras Systems Inc., Cary, NC
Tail Cuff System	BP-2000, Visitech Systems, Apex, NC
Waage	Analysenwaage H-20T, Mettler, Gießen
Wärmeblöcke	Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Western Blot Kammer	Bio-Rad Laboratories, München
Zentrifugen	Kippzentrifuge, Labofuge 400, Heraeus, Hanau Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg Haematokrit 210, Hettich, Tuttlingen

2.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Braunülen, 26G	Kendall, Neustadt
Deckgläschen	Labonord, Mönchengladbach
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Insulinspritzen	BD Medical, Le Pont de Claix Cedex, France
Kanülen, 30G	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Kanülen 19G	Becton Dickinson, Heidelberg
Kapillaren (0,5 µl, 1µl, 5µl Na-hep., 75 µl Na-hep.)	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt
Light Cycler 480 Multiwell Platten 96	Roche, Mannheim
Nähseide 7-0	Resorba Wundversorgung GmbH, Nürnberg
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Polyethylen-Tubing (0,61+0,97 mm)	Harvard Apparatus, Holliston, MA

Produkt	Hersteller
Polyethylen-Tubing (2 mm)	Science Products, Hofheim
PP-Röhrchen 13ml mit Rundboden	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße Eppendorf-Cup (0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße Falcon-Tube (15ml, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht
VICRYL-Fäden 3-0	Ethicon, Norderstedt

2.3 Chemikalien und Pharmazeutika

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf
Amilorid	Sigma Aldrich, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
Complete Puffer	Roche, Mannheim
Dimazon (Furosemid)	Intervet, Unterschleißheim
Direkt-PCR-Lyse-Reagenz	Peqlab, Erlangen
DNA-ladder, 100 bp	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
ELISA-Kit	Diagnostic Biochem Canada, London, Ontario, Kanada
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Evans Blue	Sigma Aldrich, München
First Strand Buffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
FITC-Inulin	Sigma Aldrich, München
GoTaq DNA Polymerase, 5 U/µl	Promega, Mannheim
GoTaq Reaction Buffer Green, 5x	Promega, Mannheim
Heparin (5000 I.E./ml)	Roche, Mannheim
Hepes	Sigma Aldrich, München
Hydrochlorothiazid	Sigma Aldrich, München
Inactin (Thiobutabarbital)	Sigma Aldrich, München

Produkt	Hersteller
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen
Ketamin	CP-Pharma, Burgdorf
Methanol	Merck, Darmstadt
M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/µl	Invitrogen, Karlsruhe
Nukleasefreies Wasser	GibcoBRL, Eggenstein
Oligo(dT)15 Primer, 0,5µg/µl	Promega, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	Promega, Freiburg
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma Aldrich, München
Primer	Biomers.net
Proteinase K	Peqlab, Erlangen
Radioimmunoessay-Kit	DiaSorin, Stillwater, MN
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
SYBR® Green PCR Kit	Roche, Mannheim
TRIzol®-Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
Xylazin	Ratiopharm, Ulm

2.4 Futtermittel

Produkt	Hersteller
Ssniff EM R/M Na-arm (<0,03 % NaCl)	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Ssniff EM R/M Kontrolle	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest

3. Methoden

3.1 Stoffwechselkäfigexperimente

Die Bestimmung von Urinvolumen und Trinkvolumen erfolgte in Stoffwechselkäfigen, die das separate Auffangen von Urin und Kot ermöglichen. Um den Stress für die Versuchstiere aufgrund der sozialen Deprivation zu reduzieren, wurde vor Versuchsdurchführung jeweils eine Eingewöhnungszeit von drei Tagen eingehalten. Futter und Wasser standen den Mäusen in den Stoffwechselkäfigen ad libitum zur Verfügung.

3.2 Urinosmolarität

Die Urinosmolaritäten wurden unter Standard- und Niedrigsalzbedingungen aus Spontanurinproben bestimmt, um die Gefahr von Kontaminationen durch Futterreste oder Kot weitgehend zu minimieren. Die Messung erfolgte anhand der Gefrierpunktserniedrigung, wozu jeweils ein Probenvolumen von 50 µl benötigt wurde. Durch Messung der Gefrierpunktserniedrigung wässriger Lösungen im Vergleich zum Gefrierpunkt reinen Wassers kann direkt die Osmolarität einer Lösung bestimmt werden. Um die Konzentrationsfähigkeit der Niere zu evaluieren, wurden die Urinosmolaritäten zudem nach Wasserdeprivation für 48 h bestimmt. Die Gewinnung des Urins erfolgte hierbei mittels Blasenkatheterisierung weiblicher Mäuse über die Urethra mit 26G-Braunülen unter Kurznarkose mit Isofluran.

3.3 Blutdruckmessung

Die Messung des systolischen Blutdruckes erfolgte nicht-invasiv mit der „Tail-Cuff-Methode“, die analog zur Riva-Rocci-Methode beim Menschen funktioniert. Die Mäuse wurden hierzu mit Hilfe von Restrainern fixiert und es erfolgte zunächst eine 10-minütige Aufwärmphase bei ca. 37°C, um eine Dilatation der Schwanzarterie zu induzieren. Die Druckmanschette wurde direkt an der Schwanzwurzel platziert und distal davon der Drucksensor angebracht. Blutdruck und Herzfrequenz wurden computergestützt aufgezeichnet. Nach einer Eingewöhnungsphase von drei Tagen erfolgten an drei aufeinanderfolgenden Tagen je drei Messungen pro Maus, aus denen zur statistischen Auswertung jeweils ein Mittelwert pro Versuchstier gebildet wurde.

3.4 Blutvolumen

Blutvolumen und Plasmavolumen wurden anhand des Verteilungsvolumens von Evans Blau, einem Farbstoff, der an Serum-Albumin bindet, bestimmt. Die Injektion der Evans-Blau-Lösung (5 mg/ml; 30 μ l/Maus) erfolgte retroorbital mit einer Insulinspritze unter Kurznarkose mit Isofluran. Es wurde eine Blutabnahme vor der Injektion (0-Wert) und zwei weitere Blutabnahmen 10 und 30 min post Inj. durchgeführt. Die Versuchstiere wurden hierzu in beleuchteten Restrainern fixiert, die zugleich durch Erwärmung eine Dilatation der Schwanzvenen induzierten. Die Blutabnahmen erfolgten durch Punktion der lateralen Schwanzvenen mit einer 30G-Kanüle. Das austretende Blut wurde mit heparinisierten 5 μ l-Kapillaren aufgenommen, die anschließend zur Zentrifugation mit Kitmasse an einem Ende verschlossen wurden. Nach der Zentrifugation wurde mit Hilfe eines Glasschneiders der Hämatokrit vorsichtig abgebrochen und ein exakt definiertes Aliquot des Plasmas durch Umpusten in 1 μ l-Kapillaren gewonnen. Das Plasma wurde mit Hepes-Puffer (0,5 M, pH=7,4) verdünnt (1:5). Um die Standardreihe zu erstellen wurde zunächst die Stocklösung im Verhältnis 1:1 mit Mausplasma (= 0-Wert) gemischt und anschließend wurden 1:50-, 1:100-, 1:500- und 1:1000-Verdünnungen mit Hepes-Puffer (0,5 M, pH=7,4) erstellt. Die Konzentration von Evans Blau im Plasma wurde mit einem Nanodrop-ND-1000-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte unter Einbeziehung des Hämatokrits anhand eines linearen Regressionsmodells.



Abb. 9 Retroorbitale Injektion Der Einstich erfolgte am medialen Augenwinkel des rechten Auges.



Abb. 10 Blutentnahme aus der lateralen Schwanzvene

3.5 Glomeruläre Filtrationsrate

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) an wachen Mäusen wurde anhand der FITC-Inulin-Clearance nach retroorbitaler Injektion einer 5%igen FITC-Inulin-Lösung determiniert. Die injizierte Menge wurde dabei in Relation zum Körpergewicht berechnet ($3,74 \mu\text{l/g KGW}$). Die Injektion erfolgte unter Kurznarkose mit Isofluran. Vor der Injektion wurde bei jedem Tier einmalig Blut als Kontrollwert abgenommen. Nach der Injektion wurden Blutabnahmen nach 3, 7, 10, 15, 35, 55 und 75 Minuten durchgeführt, wobei die tatsächlichen Zeitpunkte jeweils auf 15 Sekunden genau dokumentiert wurden. Wie bereits bei der Plasmavolumenbestimmung beschrieben, erfolgten die Blutabnahmen mit 30G-Kanülen aus den lateralen Schwanzvenen. Das in heparinisierten $5 \mu\text{l}$ -Kapillaren gesammelte Blut wurde zentrifugiert und anschließend erfolgte eine 1:10 Verdünnung des Plasmas mit Hepes-Puffer ($0,5 \text{ M}$, $\text{pH}=7,4$). Da das fluoreszenzmarkierte Inulin lichtempfindlich ist, wurden alle genannten Schritte soweit wie möglich unter Vermeidung von Lichteinfall durchgeführt. Zur Generierung einer Standardgeraden wurde die 5%ige FITC-Inulin-Lösung im Verhältnis 1:100, 1:500, 1:1000 und 1:2000 verdünnt. Die Fluoreszenz von Proben und Standardreihe wurde anschließend mit dem Nanodrop-ND-3300-Fluoreszenzspektrometer in $1,5 \mu\text{l}$ -Samples vermessen. Die GFR wurde anhand eines zwei-Kompartiment-Modells zur Bestimmung der Inulin-Kinetik kalkuliert (Qi et al., 2004).

3.6 Renaler Blutfluss

Die Anästhesie für die Messung des renalen Blutflusses erfolgte mit Thiobutabarbital und Ketamin (jeweils 100 mg/kg i.p.). Die Körpertemperatur wurde während der OP kontinuierlich mit einer Rektalsonde gemessen und mit Hilfe einer Heizplatte konstant bei 37,5-38°C gehalten. Die Maus wurde zunächst in Rückenlage auf dem OP-Tisch fixiert, wobei der Kopf deutlich überstreckt wurde. Der Hautschnitt erfolgte ventral vom Larynx bis zur Thoraxapertur. Nach stumpfer Separation bzw. Durchtrennung der Gll. mandibulares und des M. sternohyoideus wurde eine Tracheotomie mit anschließender Kanülierung der Trachea durchgeführt, um eine ungehinderte Spontanatmung während des gesamten Versuches zu ermöglichen. Zudem wurde die Atemluft für die Maus mit Sauerstoff (100%) angereichert, indem ein mit einer Sauerstoffflasche verbundener Schlauch vor der Öffnung des Trachealtubus platziert wurde. Um eine Dehydrierung zu vermeiden und den Kreislauf während des Versuches möglichst stabil zu halten, erhielt die Maus eine kontinuierliche intravenöse Infusion. Dazu wurde die rechte V. jugularis freipräpariert, cranial ligiert und anschließend mittels eines Polyethylen-Tubings katheterisiert. Über diesen Zugang wurde isotone NaCl-Lösung (0,9%) mit einer konstanten Rate von 12 µl/g KGW/h infundiert. Über die linke A. carotis wurden der Blutdruck und die Herzfrequenz gemonitort. Dazu wurde die A. carotis cranial ligiert und anschließend mit einer caudal angebrachten Schlinge so gespannt, dass der Blutfluss kurzzeitig unterbunden werden konnte. Danach konnte nach Inzision der A. carotis mit einer Mikroschere ein Polyethylenkatheter mit zwei Ligaturen ohne Blutverlust in der Arterie fixiert werden. Der Katheter war mit heparinierter Kochsalzlösung gefüllt und mit einem Druckmessfühler verbunden, so dass über einen Brückenverstärker und ein PowerLab die Aufzeichnung der Signale erfolgen konnte. Anschließend wurde das Abdomen entlang der Linea Alba eröffnet und die Blase vorverlagert und katheterisiert, so dass während des Experiments der Urin kontinuierlich gesammelt werden konnte. Nachdem die OP-Wunden mit feuchter Gaze abgedeckt worden waren, wurde die Maus auf die linke Seite gelegt, so dass die rechte Niere freipräpariert werden konnte. Dazu wurde nach einem ca. 2 cm langen Hautschnitt mit einem Kauter (um Blutungen zu vermeiden) das Peritoneum kaudal des Rippenbogens eröffnet. Anschließend wurden Fett und Faszien von der Niere so abgelöst, dass die Niere nach oben geklappt werden konnte und die A. renalis und die V. renalis gut sichtbar waren.

Die Nierenoberfläche wurde dabei zum Schutz mit einem feuchten Tupfer abgedeckt. Die A. renalis wurde beginnend bei ihrem Abgang aus der Aorta soweit wie möglich mobilisiert und von der Vene isoliert. Diese Präparation erfolgte äußerst vorsichtig, um das Auftreten ischämischer Zustände zu vermeiden. Danach wurde eine sogenannte „Flowprobe“ (0,5 PSB Nanoprobe), die einen miniaturisierten Dopplersonographen darstellt, um die A. renalis platziert und mit einem Mikromanipulator fixiert. Nach einer Äquilibrationsphase von 15-20 Minuten und dem Erreichen eines „Steady States“ wurde über ein Flowmeter das mit dem PowerLab verbunden wurde, der renale Blutfluss 15 Minuten lang aufgezeichnet. Aus den gemessenen Parametern konnte auch der renale vaskuläre Widerstand kalkuliert werden, indem der mittlere arterielle Blutdruck durch den RBF dividiert wurde. Nach Versuchsende wurden die Mäuse durch intravenöse Injektion von Pentobarbital (200 mg/kg) euthanasiert.

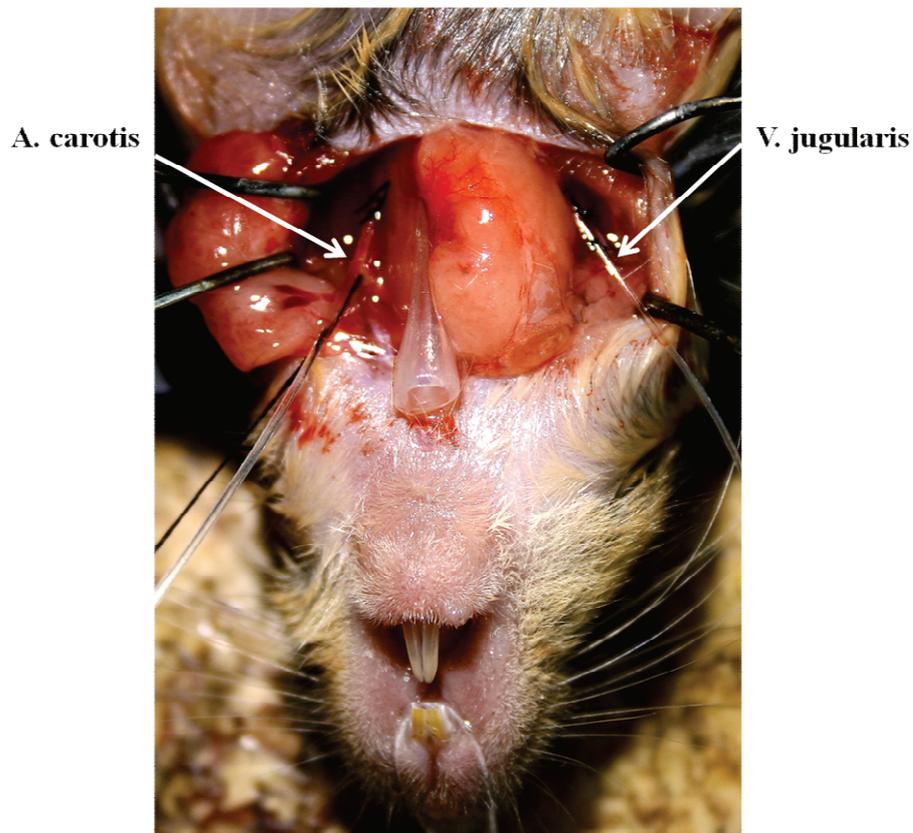


Abb. 11 Kannülierung der Trachea; Katheterisierung von A. carotis und V. jugularis

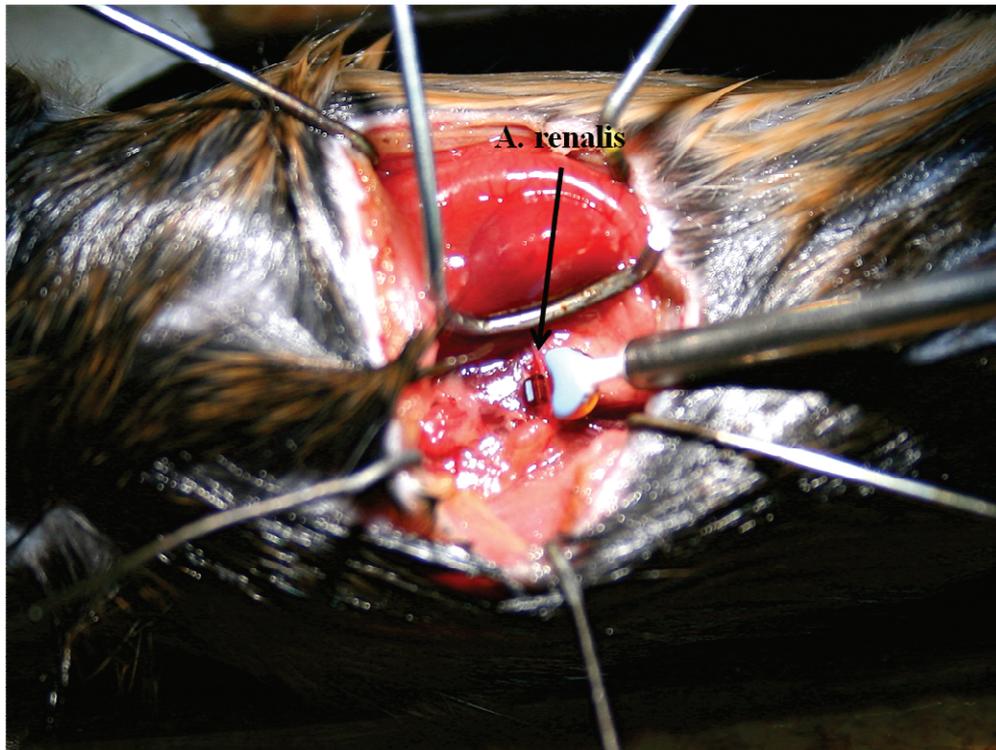


Abb. 12 Platzierung der Flowprobe an der A. renalis

3.7 Niedrigsalzversuche

Zur Untersuchung der Auswirkungen eines chronischen Salz mangels erhielten die Versuchstiere ein salzarmes Futter mit $<0,02\%$ NaCl für eine Dauer von 7 Tagen. Zur Induktion des Salz mangels erhielten die Mäuse an Tag 1 eine einmalige Injektion von Furosemid (40 mg/kg i.p.). Die Kontrolltiere wurden mit einer Standarddiät mit 0,6% NaCl gefüttert. Alle Tiere hatten während des gesamten Versuchszeitraums freien Zugang zu frischem Trinkwasser.

3.8 Versuche mit Diuretika

Um die Funktion von NKCC2, NCC und ENaC zu evaluieren, wurden Versuche mit Diuretika zur spezifischen Blockierung dieser Transporter durchgeführt. Dabei erhielten die Versuchstiere eine einmalige i.p.-Injektion Furosemid (40 mg/kg), Hydrochlorothiazid (HCT) (30 mg/kg) oder Amilorid (30 mg/kg). Anschließend wurden die Mäuse einzeln in leeren Käfigen ohne Einstreu platziert und in den folgenden 4 (Furosemid, HCT) bzw. 6 (Amilorid) Stunden wurde kontinuierlich jede Urinportion gesammelt. Dadurch wurden potentielle Verfälschungen des Ergebnisses durch Verdunstung oder Verunreinigung so weit wie möglich minimiert.

3.9 Plasma- und Urinelektrolyte

Die Konzentrationen der Elektrolyte in Plasma und Urin wurden zum Teil mittels Flammenphotometer (Na, K) und zum Teil durch ein veterinärmedizinisches Labor (Idexx Vet Med Labor, Ludwigsburg) (Cl, Ca) bestimmt.

Die Flammenphotometrie ist eine emissionsspektroskopische Untersuchung, bei der man sich die Eigenschaft zunutze macht, dass manche Atome beim Erhitzen mit einer Flamme Licht einer definierten Wellenlänge ausstrahlen, dessen Intensität gemessen werden kann. Diese Methode kann zur quantitativen Bestimmung bei Elementen der Alkali- und Erdalkaligruppe angewendet werden. Für die Messung wurden die Proben unter Standardbedingungen folgendermaßen verdünnt:

- K- Messung im Plasma: 1:100
- K-Messung im Urin: 1:2500
- Na-Messung im Plasma: 1:3000
- Na-Messung im Urin: 1:1000

Unter Niedrigsalzbedingungen kamen folgende Verdünnungen zum Einsatz:

- K- Messung im Plasma: 1:100
- K-Messung im Urin: 1:2500
- Na-Messung im Plasma: 1:1000
- Na-Messung im Urin: 1:100

Die Auswertung erfolgte anhand einer Kalibriergeraden mit 1, 2, 5 und 10 ppm Na bzw. K. Bei der Berechnung der Molarität wurden folgende Faktoren zugrunde gelegt:

- Na: 2300 ppm=100 mM
- K: 3910 ppm=100 mM

3.10 Plasmarenin- und Plasmaaldosteronkonzentration

Um die Plasmakonzentrationen von Renin und Aldosteron zu bestimmen, wurden zunächst bei den Versuchstieren Blutentnahmen durch Punktion der V. facialis durchgeführt. Dazu wurden die Tiere mit einem Zwangsgriff im Nacken fixiert,

was gleichzeitig zu einem Anstau der V. facialis führte. Die Punktion der Vene erfolgte mit einer 19G-Kanüle 2-4 mm dorso-kaudal des Haarwirbels am Unterkiefer, das Blut wurde in EDTA-beschichteten 75 µl-Kapillaren gesammelt. Die Einstichstelle wurde anschließend mit einem Tupfer komprimiert, um das Auftreten von Hämatomen zu vermeiden. Hämatokrit und Plasma wurden durch Zentrifugation der Kapillaren separiert und das Plasma bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Zur Bestimmung der Plasmareninkonzentration wurde ein Radioimmunoessay-Kit verwendet, wobei die Plasmaproben in einer 20-fachen Verdünnung eingesetzt wurden. Durch Zugabe von Renin-Substrat, das nach bilateraler Nephrektomie aus dem Blutplasma von Ratten gewonnen wurde, betragen die finalen Verdünnungen der Plasmaproben zwischen 1:500 und 1:1000. Die Plasmareninkonzentration wurde nach dreistündiger Inkubation bei 37°C („Warmwert“) als Generierung von Angiotensin I/ml/h bestimmt. Als Referenz wurde ein zweiter, analog zusammengesetzter Ansatz der Plasmaproben für den gleichen Zeitraum bei 4°C inkubiert („Kaltwert“), der gewissermaßen als „0-Wert“ betrachtet wurde, d.h. hier gemessene Ang I-Werte wurden von den Warmwerten der Plasmaproben abgezogen. Die Plasmaaldosteronkonzentration wurde mit Hilfe eines ELISA-Kits (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) bestimmt. Dazu wurden 50 µl der Plasmaproben in einer 1:5 Verdünnung eingesetzt. Die Intensität der nach der Substratreaktion gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional zur Antigen-Konzentration in den Proben und die Ergebnisse können direkt anhand der Standardkurve ermittelt werden.

3.11 RT-PCR

Die mRNA-Level von WNK1 und WNK4 wurden mittels RT-PCR bestimmt. Die RNA aus Mausnieren wurde nach dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987) mit Trizol (Lösung mit Phenol und Guanidinisothiocyanat) isoliert. Nach Homogenisierung des Gewebes erfolgte mit Chloroform die Trennung der RNA (wässrige Phase) von der organischen Phase (DNA, Proteine). Dann wurde die RNA mit Hilfe von Isopropanol aus der organischen Phase gefällt und das entstehende Pellet in RNase-freiem Wasser gelöst.

Kurzprotokoll zur RNA-Isolation mit Trizol-Reagenz:

- 1ml Trizol-Reagenz für ½ Mausniere in Sarstedt-Tubes auf Eis vorlegen
- Nieren direkt aus flüssigem Stickstoff in das Röhrchen überführen und ca. 30 s homogenisieren
- Mix in 2 ml Eppendorf-Cup überführen, 5 min bei RT stehen lassen
- 1/5 Vol. (für ½ adulte Niere also 200 µl) Chloroform zugeben, schütteln
- 20 min bei 4°C bei 12000 rpm zentrifugieren
- ca. 500 µl wässrigen Überstand in 1,5 ml Eppendorf Cup überführen (unten rote Phenolphase, dazwischen Interphase mit hydrophilen Proteinen)
- wässrige Phase 1:1 (500 µl) mit Isopropanol mischen, kräftig schütteln
- 10 min RNA ausfällen (bei Raumtemperatur)
- 10 min bei 4°C bei 12000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 1 ml 75 % Ethanol waschen
- 5 min bei 4°C bei 7500 rpm zentrifugieren, Überstand abkippen
- Pellet 10 min bei Raumtemperatur trocknen und je nach Größe in 20-300 µl RNase-freiem Wasser lösen
- max. 2 min bei 65°C im Schüttler resuspendieren, bei - 80°C lagern

Die Quantifizierung der RNA wurde mit einem Nanodrop-ND-1000-Spektrophotometer bei 260 nm und 280 nm durchgeführt. Mittels der reversen Transkription wurde die RNA in cDNA umgeschrieben.

10 µl Ansatz für die cDNA-Synthese	
1 µg	RNA (absolut)
1 µl	Oligo-(dT) ₁₅ Primer (0,5 µg/µl)
add	DEPC-H ₂ O
	5 min bei 65°C inkubieren, anschließend sofort auf Eis stellen

Anschließend wurde zu jedem 10 µl-Ansatz ein Mastermix mit folgender Zusammensetzung zugegeben:

Mastermix	
1 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (100U)
4 µl	dNTPs (2,5 mM)
4 µl	Puffer (5x first strand buffer)
1 µl	DEPC-H ₂ O

Zur cDNA-Synthese erfolgte die Inkubation des Reaktionsansatzes für 1 h bei 37°C und für 2 min bei 94°C. Für die quantitative PCR wurde die cDNA mit 20 µl nukleasefreiem Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

Anschließend wurde mit dem Lightcycler-System LC480 eine quantitative real-time PCR durchgeführt. Die Bestimmung der Produktmenge erfolgt hierbei indirekt über die Messung der Fluoreszenz (Fluoreszenzfarbstoff: SYBR Green), die proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt. Die entstandene DNA-Menge wird nach jedem PCR-Zyklus photometrisch bestimmt. Dies ermöglicht die Beurteilung des exponentiellen Verlaufs der Reaktion in Echtzeit (real time).

Reaktionsansatz für die RT-PCR	
5 µl	Lightcycler 480® SYBR Green Master
0,5 µl	sense Primer (10 pmol/µl)
0,5 µl	antisense Primer (10 pmol/µl)
3 µl	dd H ₂ O
1 µl	cDNA

Amplifizierungsprotokoll			
Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	95°C	15 min	Aktivierung
40	95°C	15 sec	Denaturierung
40	58°C	20 sec	Annealing
40	72°C	20 sec	Elongation

Es kamen Primer mit folgenden Sequenzen zum Einsatz:

- WNK1 forward: 5'-TGTAACAGCTGGTTGTGCCAGT-3'
- WNK1 reverse: 5'-ACCTGCAGAGTCGCCAGAAGC-3'
- WNK4 forward: 5'-CCCAACATCGTCCGCTTCTATG-3'
- WNK4 reverse: 5'-TGACAGAGCCTGAAGGGCCAG-3'
- β-Aktin forward: 5'-CCGCCCTAGGCACCAGGGTG-3'
- β-Aktin reverse: 5'-GGCTGGGGTGTTGAAGGTCTCAAA-3'

Die gemessenen Expressionslevel von WNK1 und WNK4 wurden auf β-Aktin als Housekeeper normalisiert

3.12 Immunhistochemie

Bei der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung bindet zunächst der primäre unkonjugierte Antikörper an das Antigen im fixierten Gewebe. Anschließend werden die Präparate mit einem zweiten fluoreszierenden Antikörper, der gegen den Fc-Teil des ersten unmarkierten Antikörpers gerichtet ist, inkubiert. Dadurch kann der Antigen-Antikörper-Komplex durch die Anregung des Fluorophors mit Licht entsprechender Wellenlänge detektiert werden. Zur Erstellung immunhistochemischer Färbungen wurde das Gewebe zunächst mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Hierzu wurde bei narkotisierten Mäusen (Thiobutabarbital/Ketamin, jeweils 100 mg/kg i.p.) nach Eröffnung des Abdomens mittels Inzision in der Linea Alba die Aorta abdominalis frei präpariert und mit einer Butterfly-Kanüle katheterisiert. Nach Vorperfusion mit 20 ml eines Saccharose-PBS-Puffers (330 mOsm, pH=7,4) erfolgte die Fixierung durch Perfusion mit einer 3%igen PFA-PBS-Lösung. Danach wurden beide Nieren entnommen, mit einer Rasierklinge halbiert und über Nacht in 3% PFA/PBS (für die Einbettung in Paraffin) bzw. in einer Saccharose-PBS-Lösung (800 mOsm, pH=7,4, für Kryoschnitte) inkubiert. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin bzw. Tissue-Tek. Folgende primäre Antikörper kamen zum Einsatz:

- NKCC2 (Mutig et al., 2007)
- NCC (Mutig et al., 2007)
- pNKCC2 (Antikörper erkennt pT96 und pT101 von Maus-NKCC2 (Mutig et al., 2007))
- pNCC (Charite Berlin, Institut für vegetative Anatomie, Antikörper erkennt pT53, pT58 und pS71 von Maus-NCC)
- pSPAK-OSR1 (**A:** pT243-SPAK/pT185-OSR1; Antikörper erkennt pT243 von Maus-SPAK und pT185 von Maus-OSR1 [T-loop;(Vitari et al., 2005)] und **B:** pS383-SPAK/pS325-OSR1; Antikörper erkennt pS383 von Maus-SPAK und pS325 von Maus-OSR1 [S-motif;(Vitari et al., 2005)])
- β - und γ -ENaC (Haerteis et al., 2009)

Für die Detektion phosphorylierter Kinasen und Transporter wurden die Antikörper mit den korrespondierenden nicht-phosphorylierten Peptiden gesättigt (10-facher Überschuss), bevor sie auf die Schnitte appliziert wurden. Die Schnitte

wurden zunächst für 30 min mit einer Blockierlösung behandelt, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Der 1. Antikörper wurde mit dieser Blockierlösung verdünnt und für 1 h (Kryoschnitte) bzw. über Nacht (Paraffinschnitte) inkubiert. Vor dem Aufbringen des sekundären Antikörpers erfolgten mehrere Waschschriffe. Als sekundäre Antikörper kamen fluoreszierende Cy2-, Cy3- oder Cy5-konjugierte Antikörper (Dianova) sowie HRP-konjugierte Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) zum Einsatz. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit konfokalen Mikroskopen.

3.13 Western Blot

Für die Anfertigung eines Immunoblots wurden die Mausnieren zunächst mit einer adäquaten Menge eines Puffers, der Saccharose (250 mM), Triethanolamin (10 mM), Protease-Inhibitoren und Phosphatase-Inhibitoren (pH 7.5) enthielt, homogenisiert. Das Homogenisat wurde zur Separation der Nuklei zentrifugiert (1000 g für 15 min) und die Überstände wurden per Gel-Elektrophorese in einem 10 %igen Polyacrylamid-Gel in Proteinbanden aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran transferiert und mit gegen WNK1 (Yang et al., 2007a) oder β -Aktin (Sigma Aldrich) gerichteten Primärantikörpern inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern und die entstehende Chemilumineszenz wurde durch das Auflegen eines Röntgenfilms detektiert. Die quantitative Auswertung erfolgte durch Densitometrie.

3.14 Statistik

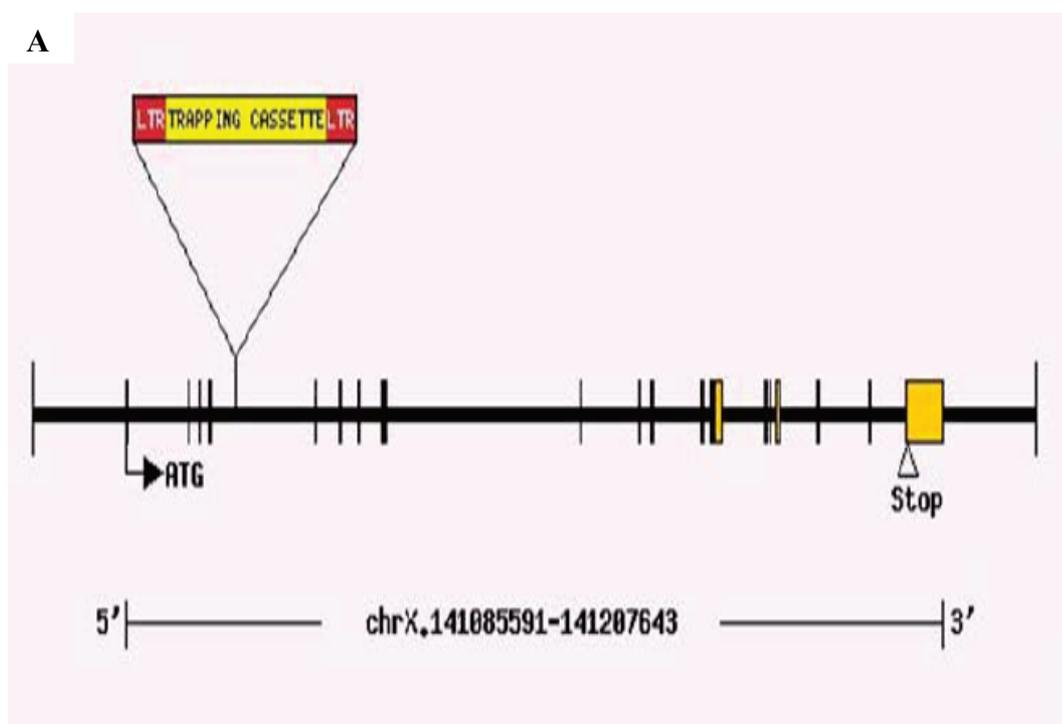
Die Daten wurden grundsätzlich kalkuliert als Mittelwert \pm SEM. Die Auswertungen der Messwerte und die Erstellung der Graphen erfolgten mit Microsoft Excel 2007 und GraphPad Prism 5. Die statistischen Vergleiche wurden mit dem Student-t-Test oder - falls erforderlich - mit einer Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni Test, durchgeführt.

V. ERGEBNISSE

1. Generierung einer WNK3-defizienten Maus-Linie

In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche an generell WNK3-defizienten Mäusen durchgeführt. Die Generierung der WNK3-KO-Maus erfolgte mittels Transfektion embryonaler Stammzellen von Mäusen mit einem Gene-Trap-Targeting-Vektor, wobei der Vektor in das Intron 5 des WNK3-Gens integriert wurde. Mittels RT-PCR wurde das Fehlen der Expression des Wildtyp-WNK3-Transkripts in der WNK3-KO-Linie verifiziert. Um dabei die bekannten, in der Einleitung beschriebenen Isoformen von WNK3 zu berücksichtigen, kamen Exon-spezifische Primer zum Einsatz, die in Exon 16 (Sense Primer) und Exon 18a, 18b und 22 (Antisense Primer) lokalisiert sind. Alle verwendeten Primer wurden so gewählt, dass sie stromabwärts von der Insertionsstelle des Gentargetingvektors liegen. Erwartungsgemäß waren die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse bei den WNK3-KO-Mäusen für alle genannten WNK3-Isoformen negativ.

Die WNK3-KO-Mäuse waren normal lebensfähig und zeigten im Allgemeinen betrachtet keinerlei Auffälligkeiten hinsichtlich Anatomie, Verhalten oder Fertilität.



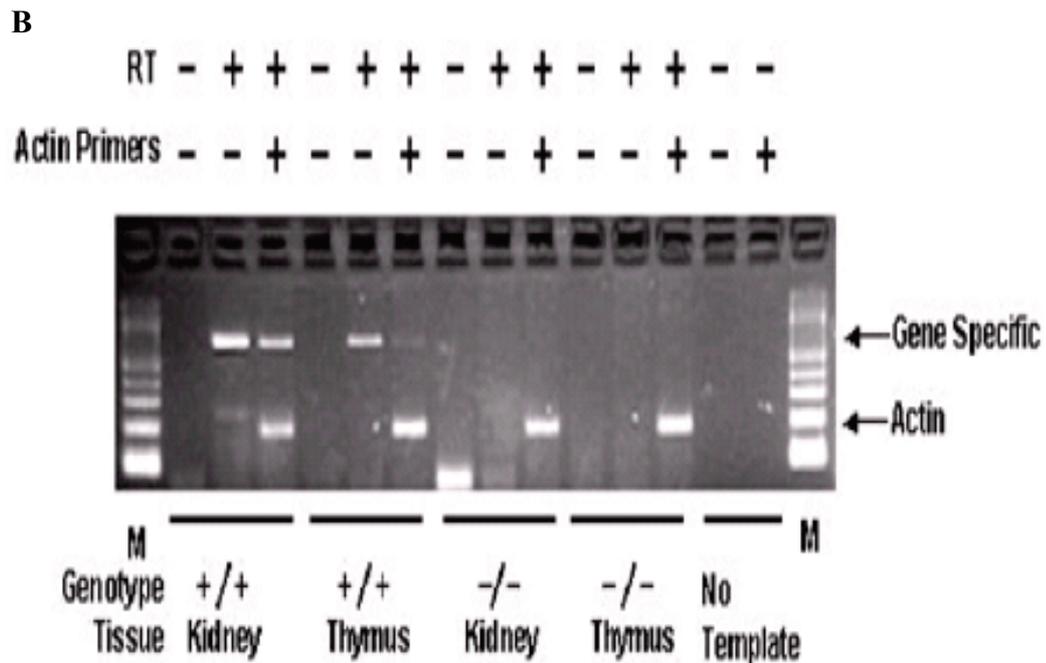


Abb. 13 Generierung einer WNK3-defizienten Mauslinie (A) Schema der Integration des Gene-Trap-Targeting-Vektors in Intron 5 des WNK3-Gens auf dem X-Chromosom (B) RT-PCR-Analyse von WNK3-Transkripten in Niere und Thymus von WT- und WNK3-KO-Mäusen

2. Blutdruck und Blutvolumen

2.1 Systolischer Blutdruck

Als Parameter, der entscheidend von der Physiologie des Wasser- und Elektrolythaushaltes abhängt und somit Hinweise auf Veränderungen der Nierenfunktion geben kann, wurde der Blutdruck bei wachen Mäusen mittels der nicht-invasiven Tail-Cuff-Messung bestimmt. Diese Methode ist nach entsprechend sorgfältigem Training der Versuchstiere einfach in der Durchführung und bietet - beispielsweise im Vergleich zu Messungen unter Narkose - den großen Vorteil weitgehend unverfälschter Messwerte. Zur Auswertung wurde hier der systolische Blutdruck herangezogen, wobei sich bei vergleichbaren Herzfrequenzen (WT: 655.6 ± 23.17 bpm; KO: 684.9 ± 17.33 bpm) keine Unterschiede zwischen Wildtyp- (119.3 ± 1.5 mmHg; n=12) und WNK3-KO-Mäusen ($121,9 \pm 1,3$ mmHg; n=12) zeigten. Es scheint demnach keine pathologische Beeinträchtigung der Blutdruckhomöostase bei den WNK3-defizienten Mäusen vorzuliegen.

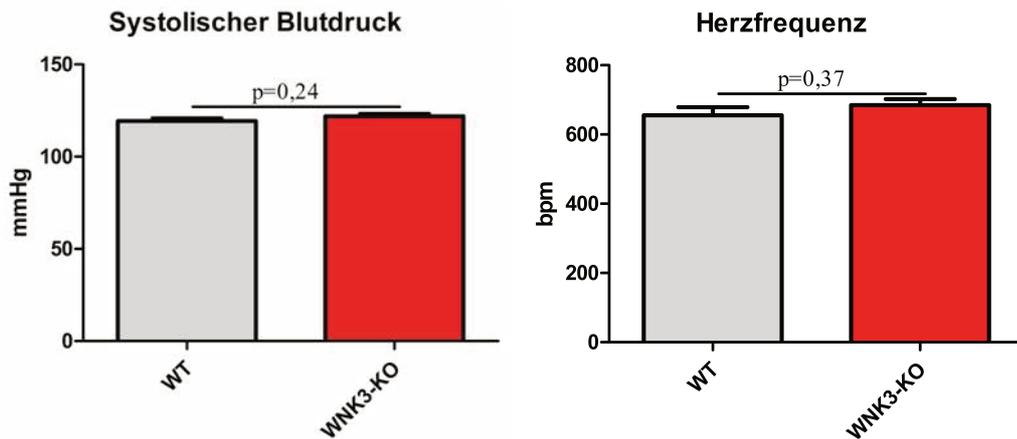


Abb. 14 Blutdruckmessung Der Blutdruck wurde bei WT- und WNK3-KO-Mäusen mittels der Tail-Cuff-Methode gemessen (jeweils n=12). Es gab keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen hinsichtlich des systolischen Blutdrucks. Die ermittelten Herzfrequenzen waren bei WNK3-KO-Mäusen und Kontrolltieren vergleichbar.

2.2 Plasmavolumen und Blutvolumen

Um diese Befunde zu präzisieren, wurde das Plasmavolumen anhand der Evans-Blue-Methode bestimmt. Analog zum Blutdruck sind auch beim Plasmavolumen die Werte bei den WNK3-KO-Mäusen ($3,59 \pm 0,13\%$ des KGW; n=13) vergleichbar mit denen der Kontrolltiere ($3,56 \pm 0,13\%$ des KGW; n=12). Unter Einbeziehung des Hämatokrits (WT: $49,5 \pm 0,5\%$; KO: $49,9 \pm 0,6\%$) wurde zudem das Gesamtblutvolumen kalkuliert. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtypen ($7,0 \pm 0,2\%$ des KGW) und den WNK3-KO-Mäusen ($7,3 \pm 0,3\%$ des KGW).

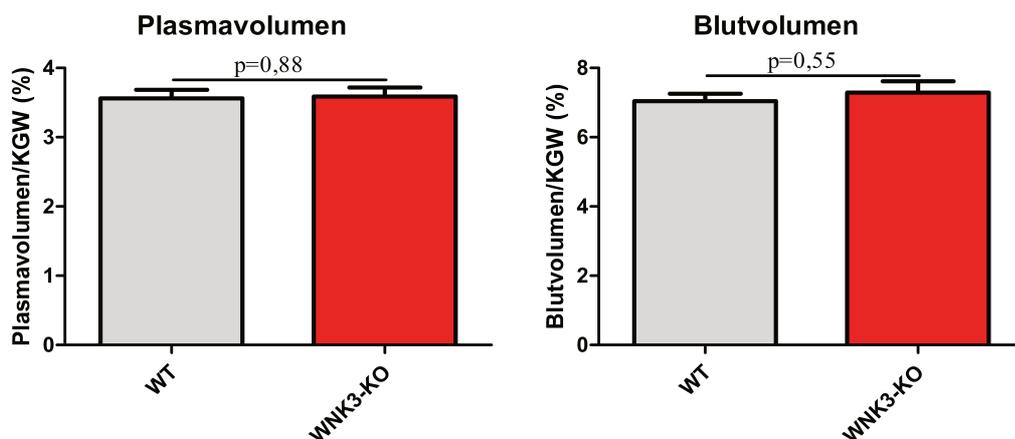


Abb. 15 Plasmavolumen und Blutvolumen Plasmavolumen und Blutvolumen, jeweils bezogen auf das Körpergewicht, waren vergleichbar bei Wildtyp- (n=12) und WNK3-KO-Mäusen (n=13).

3. Nierendurchblutung

3.1 Renaler Blutfluss

Die Messung des renalen Blutflusses bei narkotisierten Mäusen erfolgte mittels einer Flowprobe, die nach dem Doppler-Prinzip funktioniert. Es zeigten sich bei der RBF-Bestimmung keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-Mäusen ($1,35 \pm 0,09$ ml/min) und WNK3-KO-Mäusen ($1,42 \pm 0,04$ ml/min; jeweils $n=5$). Auch bezogen auf das Körpergewicht waren die Flussraten vergleichbar bei WNK3-KO-Mäusen ($0,054 \pm 0,004$) und Kontrolltieren ($0,055 \pm 0,001$). Die während des Experiments parallel durchgeführte arterielle Blutdruckmessung an der A. carotis ergab 97 ± 5 mmHg bei den WNK3-KO-Mäusen und 91 ± 5 mmHg bei den Kontrolltieren. Somit war auch der aus Blutdruck und RBF kalkulierte renale Gefäßwiderstand bei beiden Genotypen ähnlich ($68,3$ mmHg \times min/ml bei WNK3-KO-mäusen und $67,4$ mmHg \times min/ml beim Wildtyp). Die Nierendurchblutung ist also bei den WNK3-KO-Mäusen nicht beeinträchtigt.

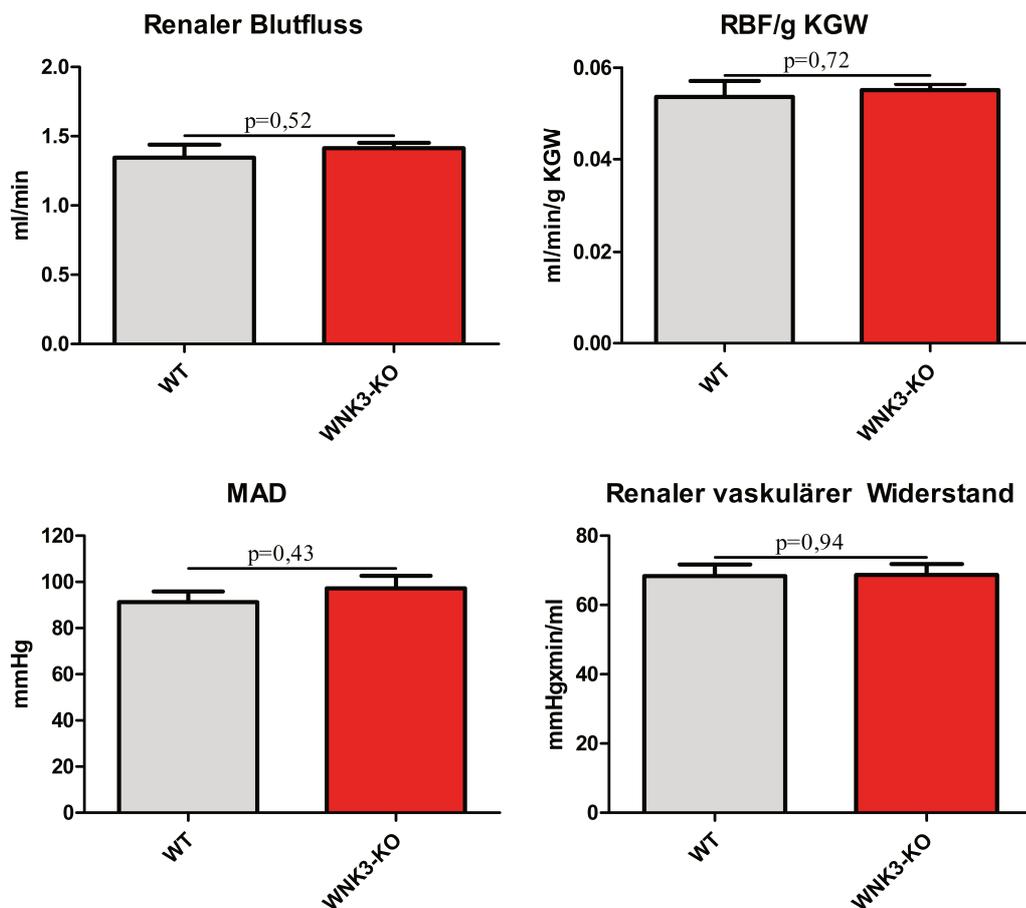


Abb. 16 RBF Der renale Blutfluss und der renale vaskuläre Widerstand waren bei beiden Genotypen vergleichbar

3.2 Glomeruläre Filtrationsrate

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) ist eine wichtige Größe zur Beurteilung der Nierenfunktion und beschreibt das Volumen, das pro Zeiteinheit von den Glomeruli filtriert wird. Die GFR ist nicht konstant, sondern schwankt beispielsweise abhängig von der Tageszeit. Darüber hinaus wird die GFR unter anderem beeinflusst von Alter, Geschlecht, Zusammensetzung der Nahrung und natürlich pathologischen Veränderungen. Um die Schwankungen möglichst klein zu halten, wurde die GFR separat bei adulten männlichen und weiblichen Tieren gleichen Alters bestimmt. Es zeigte sich kein Geschlechtsdimorphismus (WT female vs WT male: $p=0,39$; KO female vs KO male: $p=0,89$), daher wurden bei der abschließenden Auswertung die beiden Genotypen unabhängig vom Geschlecht verglichen. Sowohl hinsichtlich der Absolutwerte (Wildtyp: $326,9 \pm 17,2 \mu\text{l}/\text{min}$, $n=11$; WNK3-KO: $323,1 \pm 8,2 \mu\text{l}/\text{min}$, $n=12$) als auch bei Bezug auf 100g Körpergewicht (Wildtyp: $1400 \pm 3.97 \mu\text{l}/\text{min}$, $n=11$; WNK3-KO: $1396 \pm 53.73 \mu\text{l}/\text{min}$, $n=12$) war die glomeruläre Filtrationsrate bei beiden Genotypen vergleichbar. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den physiologischen Messwerten von Blutdruck und renalem Blutfluss.

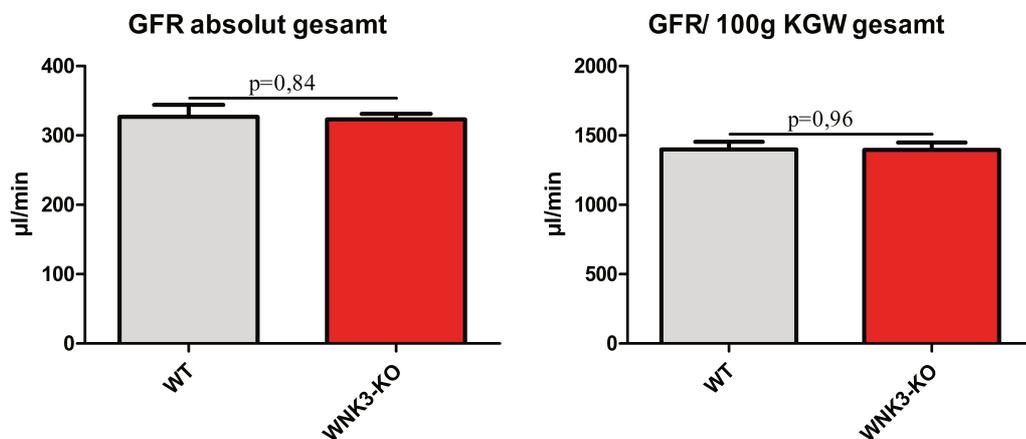


Abb. 17 GFR gesamt Die GFR wurde sowohl als Absolutwert als auch bezogen auf 100g KGW berechnet. Die Messung ergab ähnliche Ergebnisse bei Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen.

GFR absolut ($\mu\text{l}/\text{min}$)			
	MW\pmSEM	n	p-Wert
WT fem.	298.0 \pm 22.75	4	0,15
WNK3-KO fem.	333.4 \pm 7.982	5	
WT mask.	343.4 \pm 22.36	7	0,30
WNK3-KO mask.	315.7 \pm 12.64	7	
GFR/ 100g KGW ($\mu\text{l}/\text{min}$)			
WT fem.	1466 \pm 97.71	4	0,53
WNK3-KO fem.	1396 \pm 53.73	5	
WT mask.	1362 \pm 65.25	7	0,81
WNK3-KO mask.	1389 \pm 86.68	7	

Tab. 5 GFR bei männlichen und weiblichen Mäusen Bei der GFR-Messung wurden zunächst die Geschlechter getrennt betrachtet. Die Messergebnisse differierten nicht zwischen männlichen und weiblichen Mäusen und waren auch hinsichtlich der Genotypen vergleichbar.

4. Urinexkretion und Trinkverhalten

4.1 Basale Urinosmolarität

Durch Messung der basalen Urinosmolarität können Rückschlüsse gezogen werden auf die Konzentrierungsfähigkeit der Niere und die Kapazität der renalen Natriumreabsorption. Die Urinosmolarität wurde durch Gefrierpunktniedrigung in Spontanurinproben bestimmt, um Verfälschungen durch Verunreinigungen weitestgehend auszuschließen. Ebenso wie bei der GFR-Messung wurden auch hier die Experimente separat für männliche und weibliche Tiere durchgeführt. Es sind keine geschlechtsspezifischen Unterschiede erkennbar (WT female vs. WT male: $p=0,89$; KO female vs. KO male: $p=0,96$), daher wurden für die Auswertung letztlich wiederum alle Messwerte beider Genotypen herangezogen. Die Basalwerte der Wildtypmäuse lagen bei 1804 ± 62 mosmol/kg ($n=45$) und auch

die Urinosmolaritäten der WNK3-KO-Mäuse waren mit 1819 ± 61 mosmol/kg ($n=40$) im Normalbereich. Die Messung der Urinosmolaritäten lieferte also keinen Hinweis auf pathologische Veränderungen der Funktionsfähigkeit renaler Ionentransporter bei den WNK3-defizienten Mäusen.

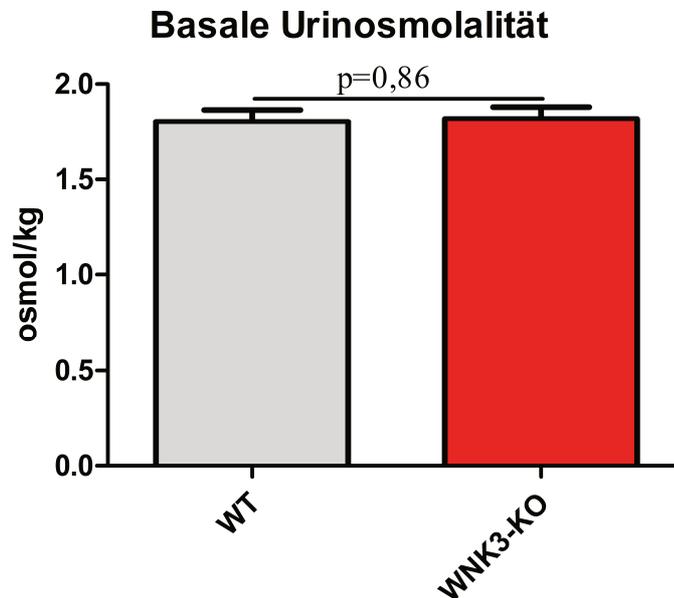


Abb. 18 Urinosmolarität gesamt Um ein möglichst stabiles Ergebnis bei den Basalwerten zu erhalten, erfolgte die Auswertung der Urinosmolarität geschlechtsunabhängig. Dadurch erhöhte sich die Gruppengröße auf 45 (WT) bzw. 40 (WNK3-KO) Tiere.

Urinosmolarität (osmol/kg)			
	MW±SEM	n	p-Wert
WT fem.	1,813 ± 0,096	22	0,98
WNK3-KO fem.	1,816 ± 0,096	20	
WT mask.	1,796 ± 0,082	23	0,82
WNK3-KO mask.	1,823 ± 0,077	20	

Tab. 6 Urinosmolarität bei männlichen und weiblichen Tieren Bei der basalen Bestimmung der Urinosmolarität wurde das Auftreten eines Geschlechtsdimorphismus ausgeschlossen. Die Messwerte waren auch hinsichtlich des Genotyps vergleichbar.

4.2 Urinosmolarität nach 48h Wasserentzug

Mäuse sind grundsätzlich in der Lage, den Urin wesentlich stärker zu konzentrieren als der Mensch. Daher muss ein Wasserentzug, der dazu dient, potentielle Beeinträchtigungen der renalen Konzentrierungsfähigkeit zu determinieren, über einen verhältnismäßig langen Zeitraum erfolgen. Im vorliegenden Experiment wurde nach einer Wasserrestriktion von 48 h der Urin durch Katheterisierung weiblicher Mäuse gewonnen, um die Urinosmolarität zu bestimmen. Beide Genotypen waren in der Lage, den Urin im Vergleich zu den Basalwerten unter Wassermangel deutlich zu konzentrieren auf 3440 ± 220 mosmol/kg bei den Kontrolltieren ($n=11$) und 3200 ± 180 ($n=10$) mosmol/kg bei den WNK3-KO-Mäusen.

Urinosmolarität nach Wasserrestriktion (48h)

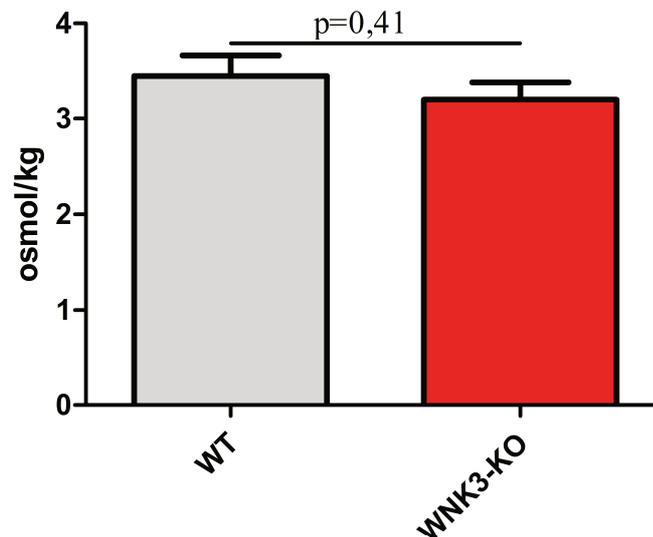


Abb. 19 Urinosmolarität nach Wasserentzug Nach 48-stündiger Wasserrestriktion wurde zur Bestimmung der Osmolarität der Urin mittels Katheterisierung gewonnen. Beide Genotypen zeigten eine vergleichbar starke Urinkonzentrierung.

4.3 Urinvolumen

In Stoffwechselfähigen wurde nach einer Eingewöhnungszeit das Urinvolumen beider Genotypen an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt. Auch hierbei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtypen ($1,63 \pm 0,06$ ml/24 hrs; $n=16$) und WNK3-defizienten Mäusen ($1,55 \pm 0,08$ ml/24 hrs; $n=16$).

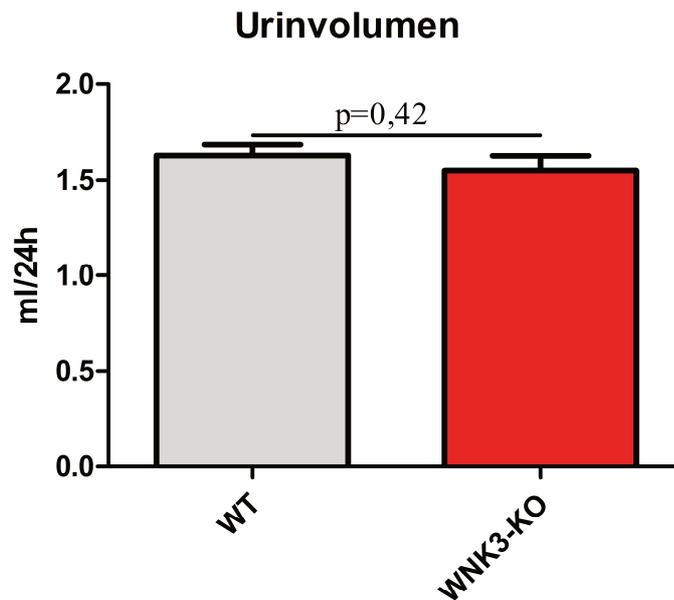


Abb. 20 Urinvolumen Das Urinvolumen war bei beiden Genotypen vergleichbar.

4.4 Trinkvolumen

Um sicherzustellen, dass die ermittelten Urinvolumina nicht durch Unterschiede im Trinkverhalten verfälscht wurden, wurden im Rahmen der Stoffwechselkäfig-Versuche auch die 24h-Trinkvolumina bestimmt, die bei beiden Genotypen vergleichbar waren. (WT: $4,539 \pm 0,1565$ ml/24h; KO: $4,412 \pm 0,1898$; jeweils $n=12$).

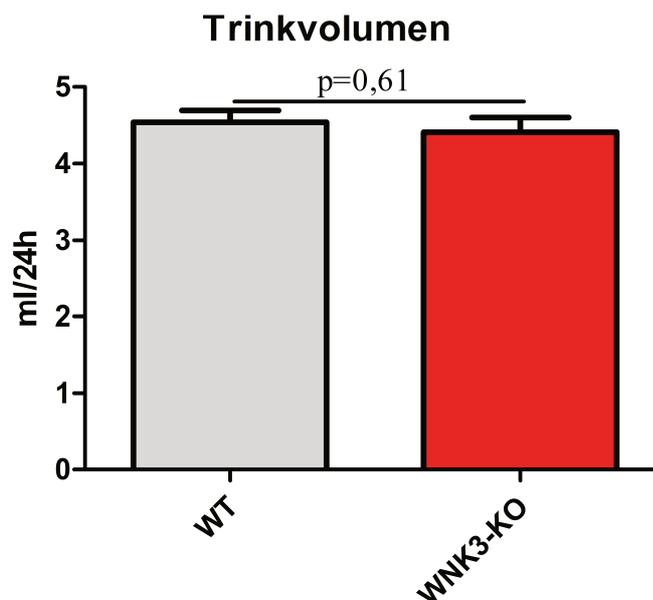


Abb. 21 Trinkvolumen Parallel zum Urinvolumen wurde bei den Stoffwechselkäfig-Versuchen auch das Trinkverhalten evaluiert. Das 24h-Trinkvolumen war bei beiden Genotypen ähnlich.

5. Elektrolyte

5.1 Plasmaelektrolyte

Die bereits beschriebenen Experimente deuten auf eine weitgehend ungestörte Nierenfunktion bei den WNK3-KO-Mäusen mit einer den Kontrolltieren vergleichbaren Reabsorptionskapazität hin. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob bei den WNK3-defizienten Tieren Verschiebungen der wichtigsten Plasmaelektrolyte vorliegen. Wie die folgende Tabelle zeigt, waren alle gemessenen Parameter im Referenzbereich und vergleichbar mit den bei den Kontrolltieren gemessenen Werten.

Plasmaelektrolyte	Wildtyp	WNK3-KO	p-Wert
Na (mmol/l)	144,6±2,7 (n=12)	148,7±4,0 (n=8)	0,39
K (mmol/l)	6,03±0,14 (n=12)	6,24±0,26 (n=8)	0,47
Cl (mmol/l)	107,4±1,3 (n=9)	109,0±1,5 (n=7)	0,44
Ca (mmol/l)	2,54±0,04 (n=8)	2,47±0,03 (n=7)	0,23

Tab. 7 Wichtige Plasmaelektrolyte bei Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen

5.2 Urinelektrolyte

Auch die Bestimmung der Exkretion von Na und K im Urin innerhalb von 24h gab keinen Hinweis auf eine pathologisch veränderte Nierenfunktion bei den WNK3-KO-Mäusen. Alle Werte waren vergleichbar mit denen der Kontrolltiere.

Urinelektrolyte	Wildtyp	WNK3-KO	p-Wert
Na (mmol/24h)	0,171±0,017 (n=8)	0,166±0,017 (n=8)	0,84
K (mmol/24h)	0,568±0,058 (n=8)	0,484±0,050 (n=8)	0,29

Tab. 8 Na- und K-Exkretion im Urin bei Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen

6. Plasmarenin- und Plasmaaldosteronkonzentration

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist ein Schlüsselement der Salz-, Wasser- und Blutdruckhomöostase und agiert als sensibles Stellglied, um eine präzise Regulation des Blutdruckes zu ermöglichen. Daher stellt die Messung der Plasmakonzentrationen der am RAAS beteiligten Komponenten einen potentiellen

Marker für Veränderungen der renalen Reabsorptionsprozesse dar. Weder bei der Plasmareninkonzentration (PRC) - gemessen anhand der Generierung von Angiotensin I - noch bei der Plasmaaldosteronkonzentration (PAC) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Die Funktion des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems scheint also bei den WNK3-defizienten Mäusen unbeeinträchtigt zu sein.

	Wildtyp	WNK3-KO	p-Wert
PRC (ng AngI/ml/h)	94,24±18,55 (n=13)	80,24±13,36 (n=14)	0,54
PAC (pg/ml)	312,9±39,38 (n=8)	223,9±22,64 (n=9)	0,06

Tab. 9 Plasmarenin- und Plasmaaldosteronkonzentration bei Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen

7. Versuche unter Niedrigsalzbedingungen

Um die Kapazität der renalen Salzreabsorption zu testen, wurden wichtige Basalwerte auch unter Niedrigsalzbedingungen erhoben. Die Mäuse erhielten zu diesem Zweck vor der Versuchsdurchführung für sieben Tage ein NaCl-armes Futter (<0,02% NaCl).

7.1 Urinosmolarität

Als wichtiger Parameter für die Konzentrierungsfähigkeit der Niere wurde nach Fütterung der salzarmen Diät (7d) die Urinosmolarität bei Wildtypmäusen und WNK3-KO Mäusen bestimmt. Hierbei wiesen WNK3-defiziente Tiere tendenziell niedrigere Werte auf als die Kontrollen (WT: 1,666±0,088; KO: 1,428 ±0.090; jeweils n=21), die Unterschiede waren jedoch trotz Gruppengrößen von über 20 Tieren nicht signifikant.

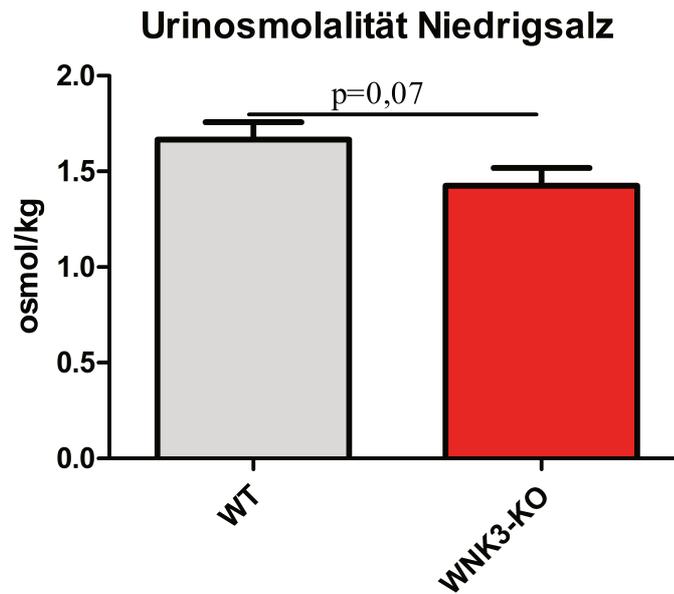


Abb. 22 Urinosmolalität unter Niedrigsalzbedingungen Nach Fütterung einer NaCl-armen Diät für sieben Tage waren die Urinosmolaritäten bei beiden Genotypen vergleichbar.

7.2 Urinvolumen

Die Versuchstiere wurden auch während der Fütterung der salzarmen Diät in Stoffwechselkäfigen gehalten, um die Urinvolumina zu bestimmen. Das hierbei ermittelte Urinvolumen der WNK3-KO-Mäuse ($1,349 \pm 0,0754$) war vergleichbar mit dem der Kontrolltiere ($1,270 \pm 0,04822$; je n=8).

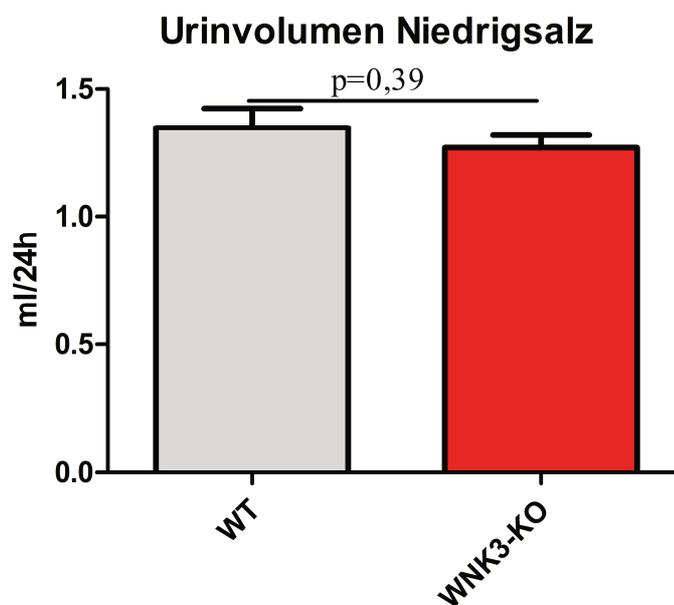


Abb. 23 Urinvolumen unter Niedrigsalzbedingungen Die Urinausscheidung innerhalb von 24h erreichte bei den WNK3-KO-Mäusen ähnliche Werte wie bei den Kontrolltieren.

7.3 Plasmaelektrolyte

Wie unter Normalfutter wurden auch unter Niedrigsalzfutter wichtige Plasmaelektrolyte gemessen. Auch hier lagen bei den WNK3-defizienten Mäusen alle Parameter innerhalb der Referenzbereiche und waren mit denen der Kontrolltiere vergleichbar.

LS Plasmaelektrolyte	Wildtyp	WNK3-KO	p-Wert
Na (mmol/l)	133,2±2,6 (n=8)	130,8±3,1 (n=8)	0,56
K (mmol/l)	5,67±0,14 (n=8)	5,44±0,14 (n=8)	0,28
Cl (mmol/l)	112,7±1,3 (n=9)	116,1±2,8 (n=7)	0,24
Ca (mmol/l)	2,30±0,05 (n=8)	2,26±0,05 (n=7)	0,55

Tab. 10 Wichtige Plasmaelektrolyte bei Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen unter Niedrigsalzbedingungen

7.4 Urinelektrolyte

Um den Datensatz zu vervollständigen wurde wie unter Standardbedingungen auch nach der Fütterung der salzarmen Diät die Exkretion von Na und K im Urin bestimmt. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und WNK3-KO-Tieren.

LS Urinelektrolyte	Wildtyp	WNK3-KO	p-Wert
Na (mmol/24h)	0,033±0,003 (n=8)	0,027±0,002 (n=8)	0,09
K (mmol/24h)	0,282±0,029 (n=8)	0,299±0,030 (n=8)	0,69

Tab. 11 Na- und K-Exkretion im Urin bei Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen unter Niedrigsalzbedingungen

8. Kompensatorische Regulation anderer WNK-Kinasen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, deuten Daten aus *in-vitro*- und zum Teil auch *in-vivo*-Experimenten darauf hin, dass die verschiedenen WNK-Kinasen bei der Aktivierung renaler Ionentransporter interagieren und so eine dynamische Regulation der Reabsorptionsprozesse an der Niere ermöglichen. Daher stellte vor dem Hintergrund des fehlenden Phänotyps der WNK3-KO-Mäuse die

Evaluierung der Level von WNK1 und WNK4 in Wildtyp und WNK3-KO-Mäusen den nächsten logischen Schritt dar.

8.1 WNK1

Die WNK1-Kinase hat in vielen Aspekten ähnliche Effekte auf Ionentransporter an der Niere wie die WNK3-Kinase (Moriguchi et al., 2005; Richardson and Alessi, 2008; Richardson et al.; Rinehart et al., 2005). Daher wäre eine kompensatorische Veränderung der WNK1-Expressions-Level in der Niere ein potentieller Mechanismus, um die fehlende Funktion der WNK3-Kinase bei der untersuchten WNK3-KO-Mauslinie auszugleichen.

8.1.1 WNK1 mRNA Expression

Zu diesem Zweck wurde zunächst mittels RT-PCR die WNK1-Expression auf mRNA-Ebene detektiert. In der Tat konnten hier signifikant gesteigerte WNK1-Level (normalisiert auf Aktin) bei den WNK3-KO-Mäusen ($1,248 \pm 0,089$; $n=4$) im Vergleich zu den Kontrolltieren ($0,685 \pm 0,078$ rU; $n=4$) nachgewiesen werden.

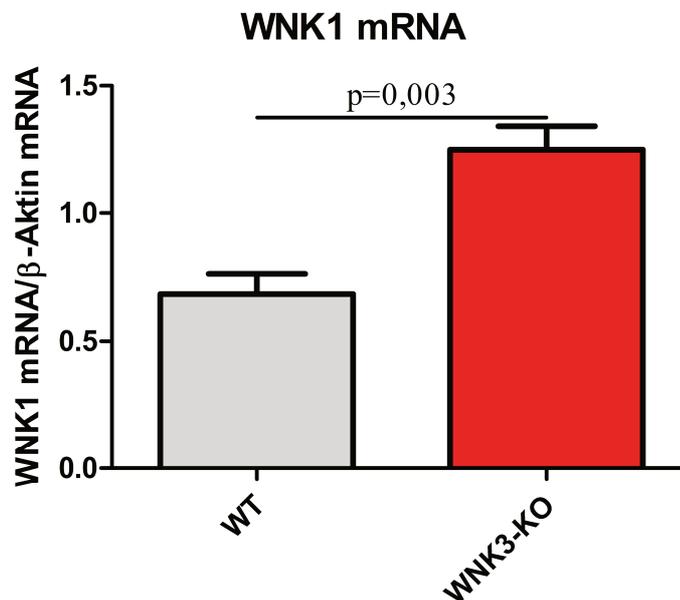


Abb. 24 WNK1-mRNA-Expression Das mRNA-Expressionslevel von WNK1 (normalisiert auf Aktin) war bei den WNK3-KO-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant gesteigert.

8.1.2 WNK1 Protein Expression

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde darüber hinaus die Expression von WNK1-Protein mittels Western-Blot analysiert. Auch auf dieser Ebene zeigte sich eine signifikante Hochregulation der Expression der WNK1-Kinase (normalisiert auf Tubulin) bei den WNK3-KO Mäusen um $118\pm 17\%$ im Verhältnis zu den Wildtyp-Kontrollen. Es konnte also sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ein signifikant gesteigertes Expressionslevel der WNK1-Kinase bei den WNK3-defizienten Mäusen nachgewiesen werden, was einen Mechanismus zur Kompensation des Funktionsverlustes der WNK3-Kinase darstellen könnte und somit zu dem nicht relevanten renalen Phänotyp der WNK3-KO-Mäuse, der bereits beschrieben wurde, führen könnte.

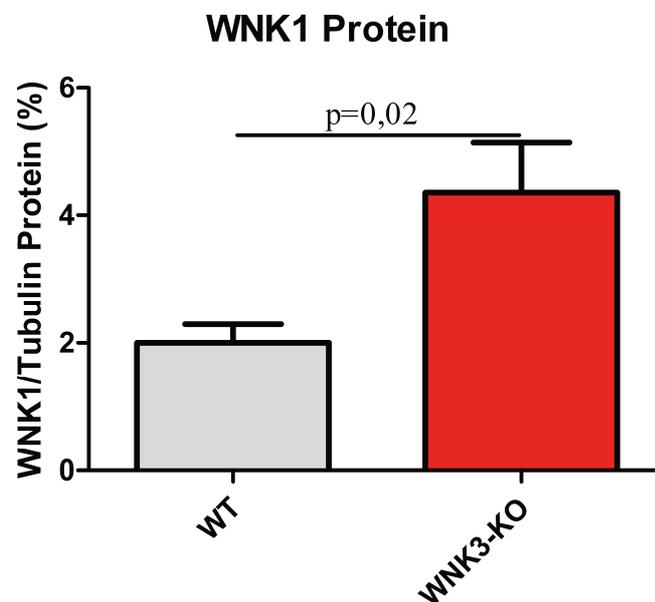


Abb. 25 WNK1-Protein-Expression Auf Proteinebene war das WNK1-Expressionslevel bei WNK3-KO-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen signifikant hochreguliert.

8.2 WNK4 mRNA Expression

Auch für den dritten Vertreter der in der Niere vorkommenden WNK-Kinasen, die WNK4-Kinase, wurden die mRNA-Expressionslevel bestimmt. Im Gegensatz zu den für die WNK1-Kinase erhobenen Befunden, konnten hier jedoch keine Unterschiede zwischen Wildtyp- ($1,246\pm 0,243$; $n=4$) und WNK3-KO-Mäusen ($1,546\pm 0,089$; $n=4$) festgestellt werden. Die WNK4-Kinase scheint also nicht an einem möglichen Kompensationsmechanismus beteiligt zu sein.

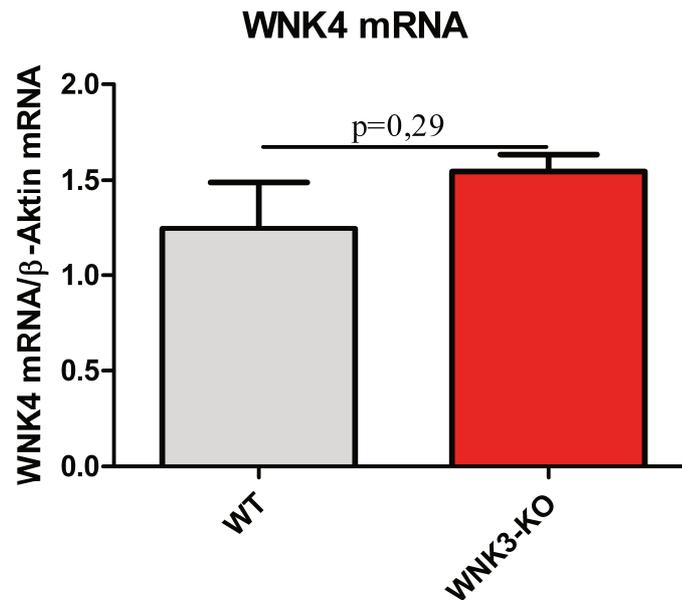


Abb. 26 WNK4-mRNA-Expression Die mRNA-Expression von WNK4 erreichte bei beiden Genotypen vergleichbare Level.

9. SPAK/OSR1 Expression

Die SPAK/OSR1-Kaskade stellt einen der wichtigsten WNK-abhängigen Signalwege dar. SPAK und OSR1 werden als Intermediärkinasen entscheidend durch WNK1 reguliert (Delpire and Gagnon, 2008). Aufgrund des Nachweises der gesteigerten Expressionslevel von WNK1, war es naheliegend im nächsten Schritt die Expression von pSPAK/OSR1 unter Standardbedingungen und nach Fütterung einer salzarmen Diät mittels Immunhistochemie zu evaluieren. Basal zeigten sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen. Unter Nidrigsalzbedingungen jedoch war die Expression von pSPAK/OSR1 bei den WNK3-KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp signifikant gesteigert. Die WNK-assoziierten Intermediärkinasen SPAK und OSR1 scheinen also zu dem Mechanismus beizutragen, der den Funktionsverlust der WNK3-Kinase kompensiert. Dies beweisen die deutlich erhöhten Expressionslevel von SPAK und OSR1.

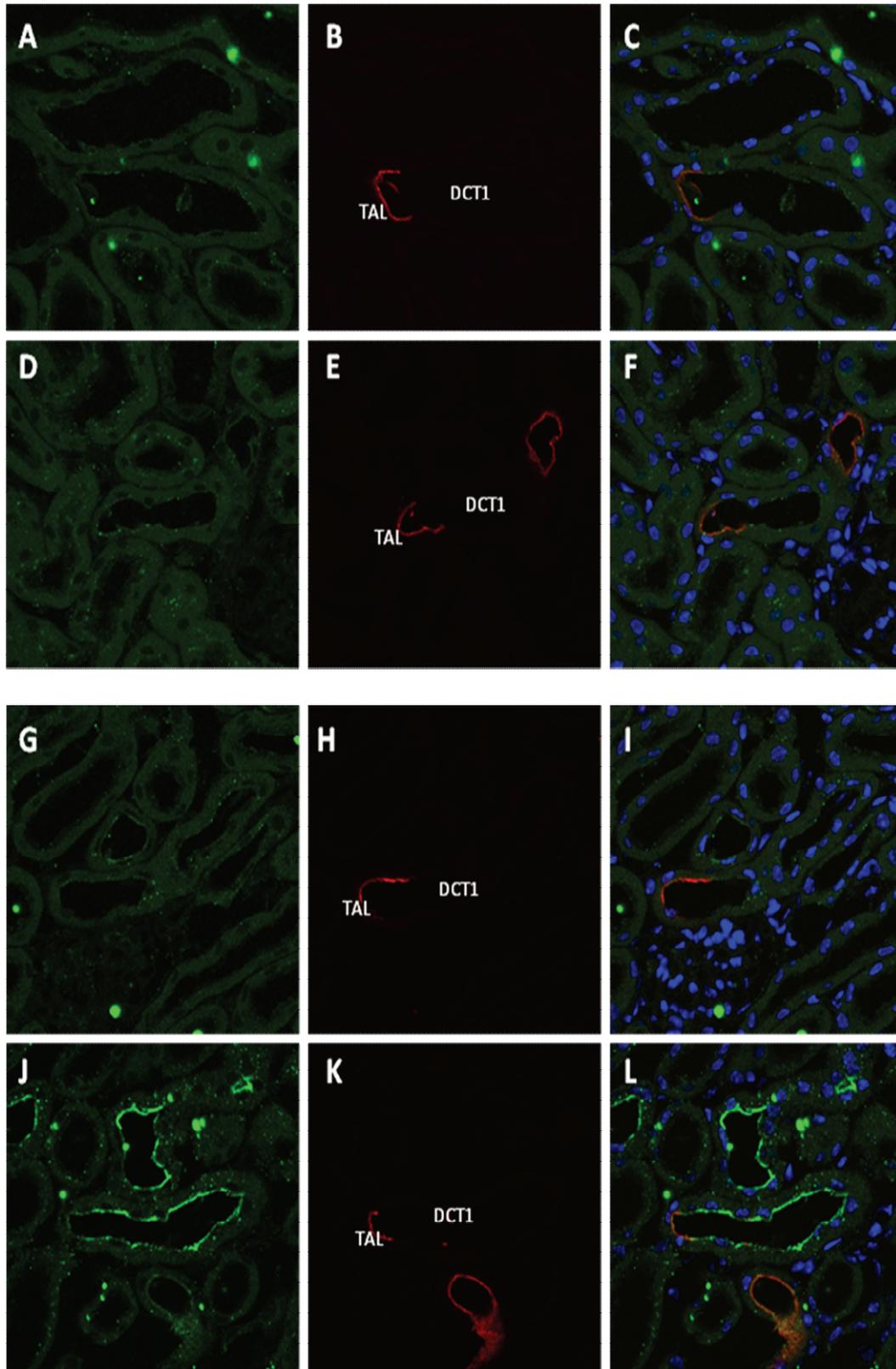


Abb. 27 Immunhistochemie von pSPAK/OSR1 Unter basalen Bedingungen war das Expressionslevel von SPAK/OSR1 bei Wildtypen (A-C) und WNK3-KO-Mäusen (D-F) vergleichbar niedrig. Unter Nidrigsalzbedingungen zeigte sich jedoch eine signifikant gesteigerte Expression von pSPAK/OSR1 bei den WNK3-KO-Mäusen (J-L) im Vergleich mit den Kontrolltieren (G-I). Kofärbungen mit NKCC2 (B, E, H, K) bestätigten die Lokalisation von pSPAK/OSR1 im TAL und im DCT, wie in den Overlays (C, F, I, L) ersichtlich wird.

10. Expression renaler Ionentransporter

Die gesteigerte Expression von WNK1 und SPAK/OSR1 bei WNK3-KO-Mäusen legte die Vermutung nahe, dass auch bezüglich der Expressionslevel renaler Ionentransporter Veränderungen nachweisbar sein könnten. Somit wurden zum einen immunhistochemische Färbungen und zum anderen funktionelle Versuche mit Diuretika durchgeführt.

10.1 NKCC2

10.1.1 NKCC2-Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen von pNKCC2 bei WNK3-KO-Mäusen und Kontrolltieren ergaben ein ähnliches Bild wie bei SPAK/OSR1: Unter basalen Bedingungen gab es keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und KO-Tieren. Unter Niedrigsalzbedingungen, die im Allgemeinen zu einer verstärkten Aktivierung zu NKCC2 führen, zeigte sich jedoch eine signifikant gesteigerte Expression von pNKCC2 bei den WNK3-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen.

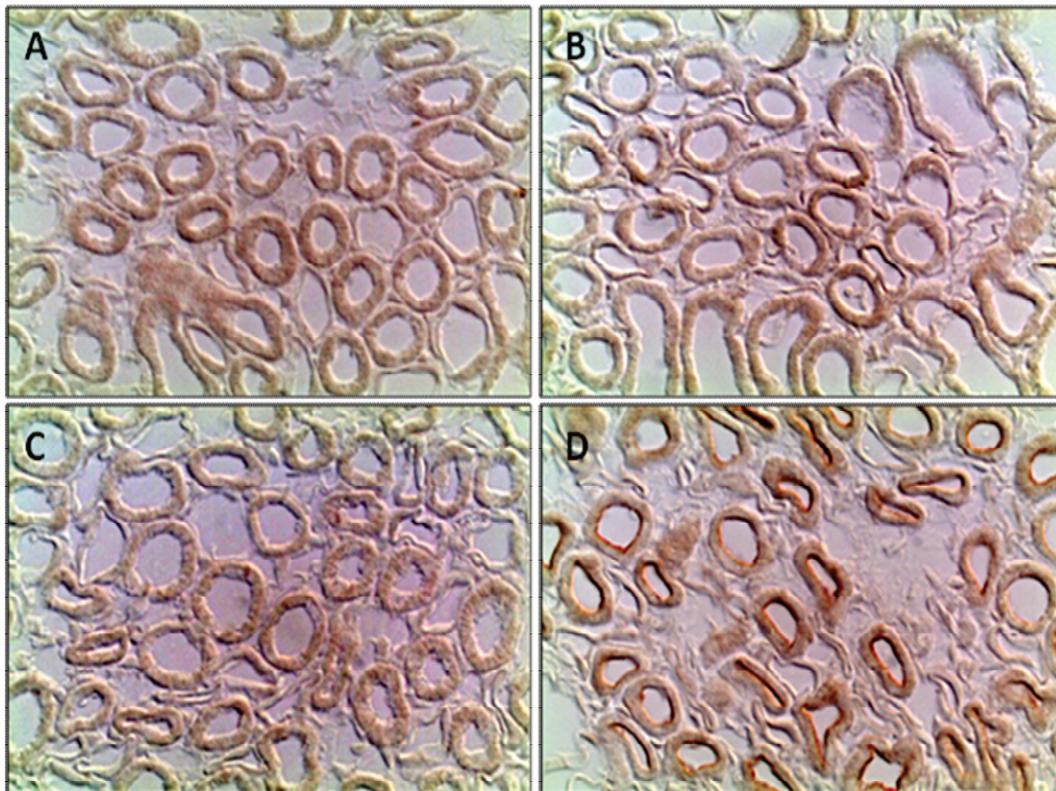


Abb. 28 Immunhistochemie von pNKCC Unter Standardbedingungen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (WT=A; KO=C), unter Niedrigsalzbedingungen jedoch war die Expression von pNKCC2 bei den WNK3-KO-Mäusen (D) signifikant höher als bei den Wildtyp-Mäusen (B).

10.1.2 NKCC2-Hemmung: Furosemid

Furosemid zählt zur Gruppe der sogenannten Schleifendiuretika, die kompetitiv die NKCC2-Aktivität hemmen und damit zu einer gesteigerten Natriurese und Diurese führen. Um die Bedeutung der bereits beschriebenen immunhistochemischen Ergebnisse auch funktionell zu evaluieren, wurden Wildtyp- und WNK3-KO-Mäuse unter Standardbedingungen und nach salzarmer Diät mit 40mg/kg Furosemid i.p. behandelt und dann die Urinvolumina 4 h nach Injektion bestimmt. Wildtyp- (n=8) und KO-Mäuse (n=7) zeigten dabei sowohl bei Normaldiät (WT: $1,04 \pm 0,09$ ml/4h; KO: $1,16 \pm 0,12$) als auch unter salzarmen Bedingungen (WT: $0,89 \pm 0,09$; KO: $1,09 \pm 0,08$) eine gleichermaßen verstärkte Diurese.

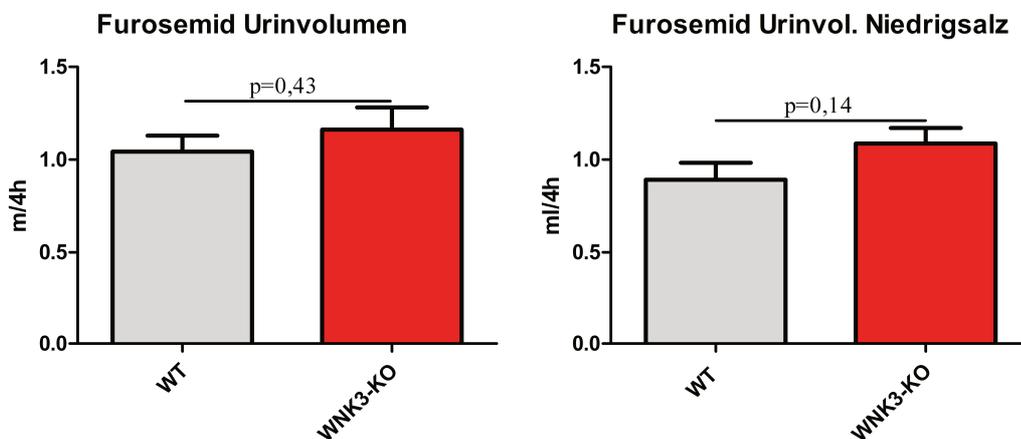


Abb. 29 Urinvolumen nach Furosemid-Injektion Beide Genotypen zeigten nach Injektion von Furosemid eine ähnlich starke Diurese, was in vergleichbaren Urinvolumina bei Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen resultierte.

10.2 NCC

10.2.1 NCC-Immunhistochemie

NCC wird ebenso wie NKCC2 durch Interaktion von WNK1, 3 und 4 über die SPAK/OSR1-Signalkaskade reguliert (Glover et al., 2009; Rinehart et al., 2005; Yang et al., 2003). Die Immunhistochemie ergab ähnliche Befunde wie schon bei SPAK/OSR1 und pNKCC2: Basal waren die pNCC-Expressionslevel bei Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen vergleichbar, während es bei salzarmen Diät zu einer signifikant höheren Expression von pNCC bei WNK3-KO-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren kam. Ebenso wie NKCC2 scheint also NCC durch gesteigerte Expression zur Kompensation der WNK3-Defizienz, an der wie bereits dargelegt auch WNK1 und SPAK/OSR1 beteiligt sind, beizutragen.

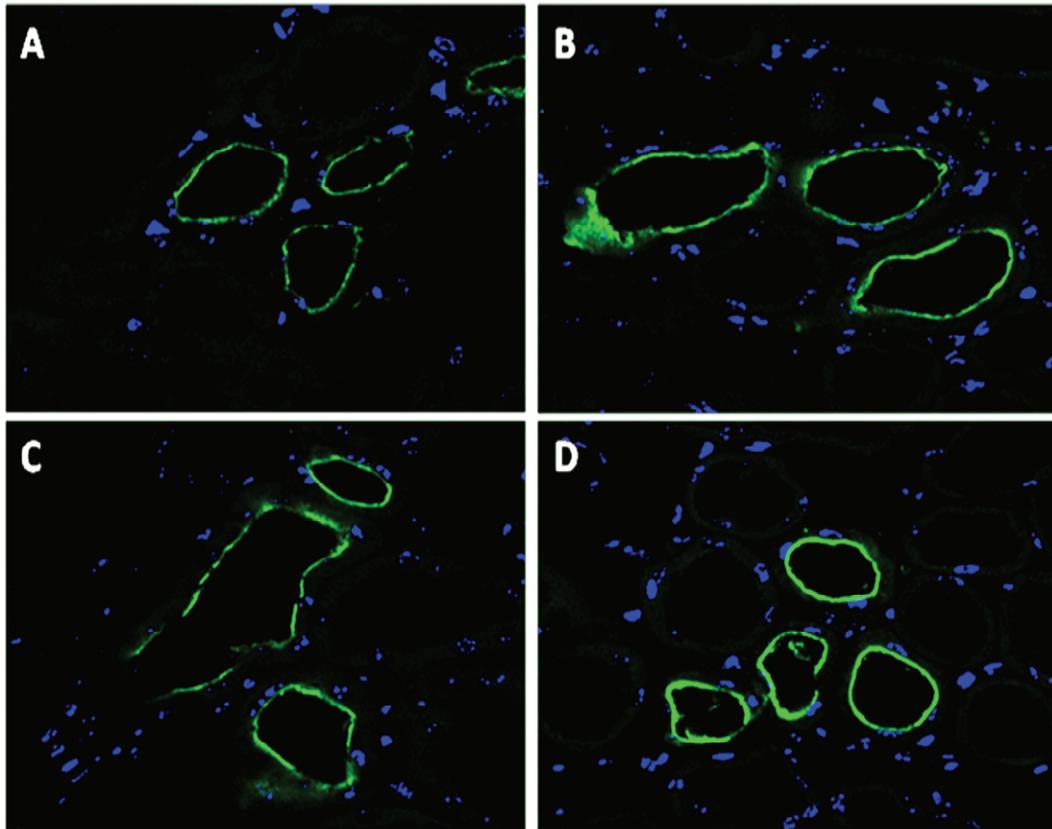


Abb. 30 Immunhistochemie von pNCC Während die Expression von pNCC unter Standardbedingungen bei Wildtypen (A) und WNK3-KO-Mäusen (C) vergleichbar war, war des Expressionslevel nach Fütterung einer salzarmen Diät bei den WNK3-KO-Mäusen (D) deutlich höher als bei den Kontrolltieren (B).

10.2.2 NCC-Hemmung: Hydrochlorothiazid

Ebenso wie für NKCC2 wurden auch für NCC funktionelle Versuche mit Diuretika durchgeführt. Thiaziddiuretika, wie das im Experiment verwendete Hydrochlorothiazid (HCT), wirken inhibitorisch auf NCC und steigern so die Natriurese und Diurese. Bei Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen wurden 4h nach Injektion von HCT die Urinvolumina bestimmt. Unter basalen Bedingungen waren die Ergebnisse bei beiden Genotypen vergleichbar (WT: $0,70 \pm 0,05$; $n=8$ und KO: $0,75 \pm 0,10$; $n=7$). Bei der Wiederholung des Experimentes unter Nidrigsalzbedingungen war das Urinvolumen 4 h p.I. bei den WNK3-defizienten Tieren ($0,92 \pm 0,04$; $n=7$) jedoch signifikant höher als bei den Kontrolltieren ($0,64 \pm 0,06$; $N=8$). NCC könnte also einen entscheidenden funktionellen Beitrag zum Kompensationsmechanismus bei den WNK3-defizienten Mäusen liefern.

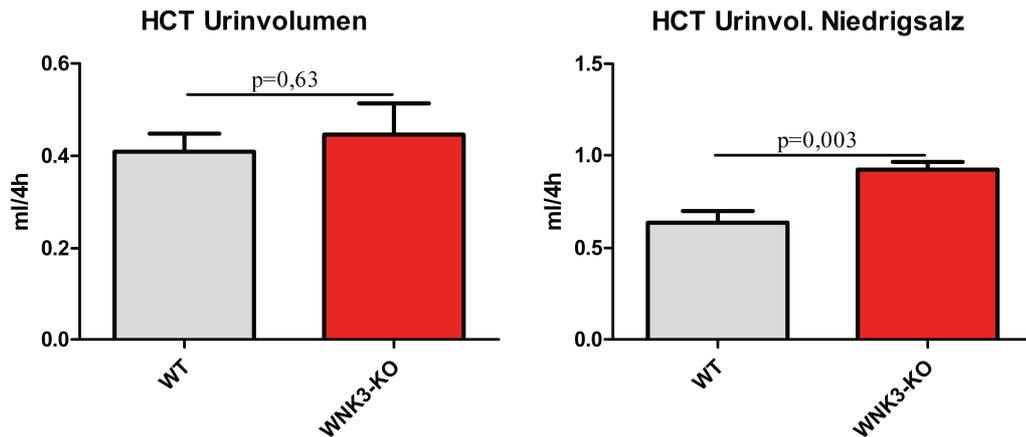


Abb. 31 Urinvolumen nach HCT-Injektion Eine Hemmung des NCC durch HCT führte unter Standardbedingungen zu einer vergleichbaren Urinausscheidung bei Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen. Bei Durchführung des Versuches unter Niedrigsalzbedingungen jedoch zeigten die WNK3-KO-Mäuse eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant gesteigerte Diurese.

10.3 ENaC

10.3.1 ENaC-Immunhistochemie

Die ENaC-Aktivität wird *in vitro* durch die WNK1-Kinase über einen SPAK/OSR1-unabhängigen Signalweg reguliert (Naray-Fejes-Toth et al., 2004; Ring et al., 2007a; Xu et al., 2005). Die gesteigerten WNK1-Expressionslevel bei WNK3-KO-Mäusen machen daher ENaC zu einem weiteren potentiellen Kandidaten für die Kompensation der fehlenden WNK3-Funktion. Immunhistochemische Färbungen zeigten jedoch weder unter Standard- noch unter Niedrigsalzbedingungen Unterschiede bezüglich der ENaC-Expression. Die vergleichbaren Expressionslevel von ENaC bei Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen scheinen also darauf hin zu deuten, dass der WNK1-assozierte epitheliale Natriumkanal keine entscheidende Rolle bei der Kompensation der WNK3-Defizienz spielt.

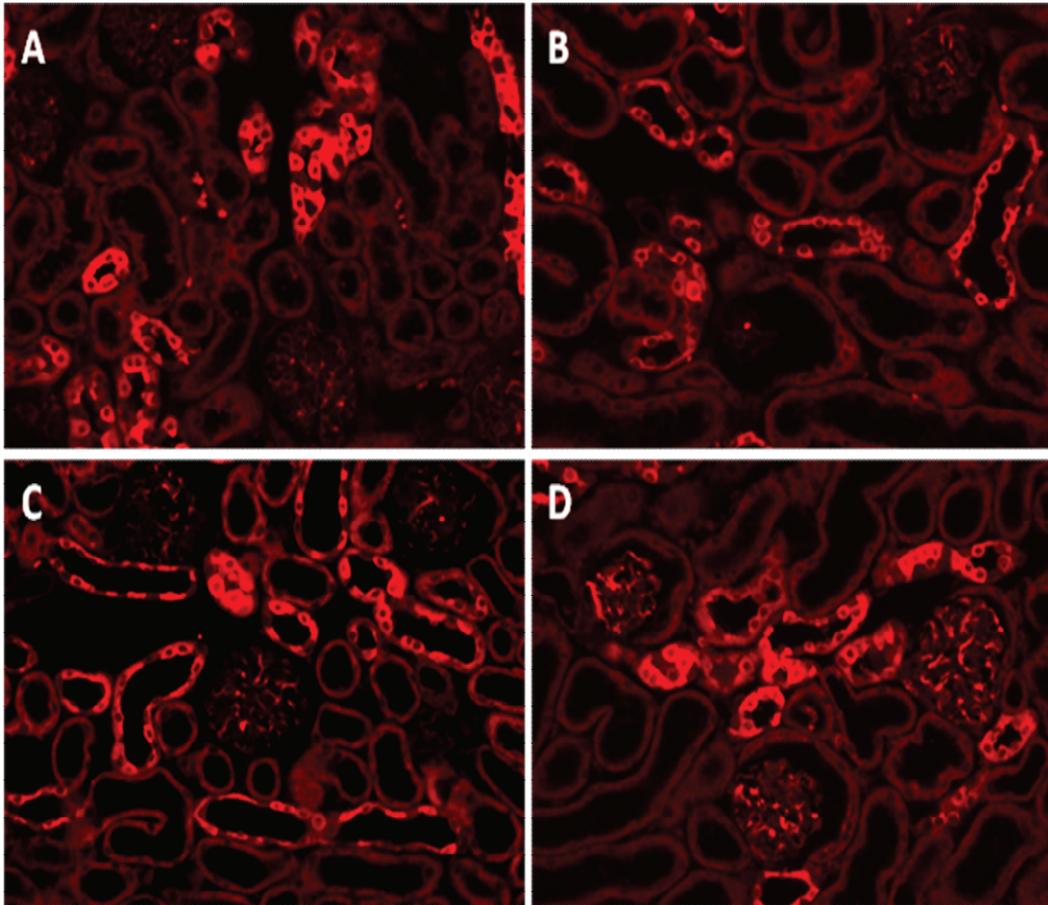


Abb. 32 Immunhistochemie von ENaC Die Expressionslevel von ENaC waren bei Wildtyp- (A, B) und WNK3-KO-Mäusen (C, D) sowohl unter Standardbedingungen (A, C) als auch unter Niedrigsalzbedingungen (B, D) vergleichbar.

10.3.2 ENaC-Hemmung: Amilorid

Als funktioneller Test für die ENaC-Aktivität wurden Mäuse mit Amilorid behandelt, das durch Hemmung der ENaC-Aktivität schwach diuretisch wirkt. Analog zu den immunhistochemischen Befunden waren die 6 h nach Amilorid-Injektion gemessenen Urinvolumina bei Wildtyp- (0.49 ± 0.03 ; $n=9$) und WNK3-KO-Mäusen (0.45 ± 0.03 $N=9$) vergleichbar.

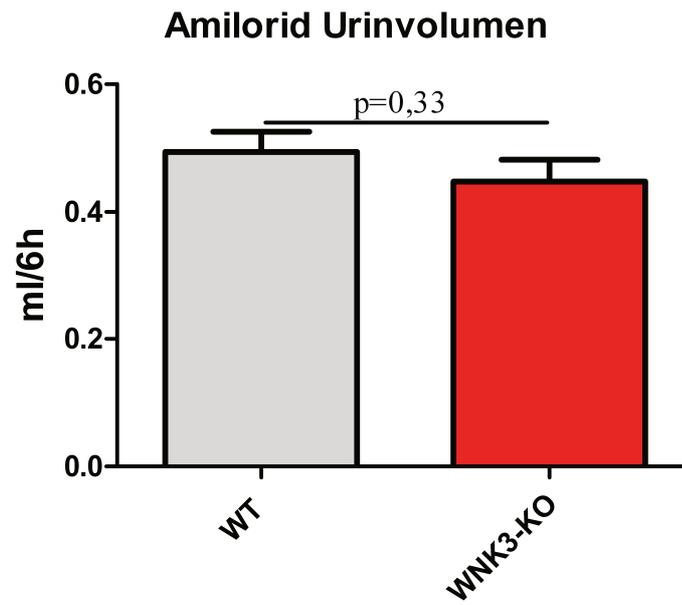


Abb. 33 Urinvolumen nach Amiloridinjektion Nach Injektion von Amilorid zeigten beide Genotypen eine vergleichbare, eher schwache Diurese.

VI. DISKUSSION

1. WNK3-*in-vitro*-Daten

Diverse Daten aus *in-vitro*-Experimenten geben Hinweise auf die physiologische Bedeutung, die WNK-Kinasen im Allgemeinen und die WNK3-Kinase im Besonderen bei der Regulation der Salz-, Wasser- und Blutdruckhomöostase spielen könnten. In diesem Zusammenhang sind vor allem die regulatorischen Effekte von WNK-Kinasen auf Ionenporter an der Niere von entscheidender Bedeutung. Die Aktivität von Ionenportern ist abhängig von der Abundanz des Transporters und vom Phosphorylierungsstatus, der sowohl die spezifische Aktivität eines Transporters als auch dessen Trafficking zur Zellmembran modulieren kann. Phosphorylierungsprozesse führen beispielsweise zu einer Aktivierung von NKCC2 sowie NCC und inhibieren KCC's. Im Umkehrschluss führt Dephosphorylierung zu einer Hemmung von NKCC2 und NCC und einer Zunahme der Aktivität von KCC (Adragna et al., 2004b; Flatman, 2008; Gamba, 2005). Wie genau die Regulation dieser Phosphorylierungsprozesse *in vivo* funktioniert und welche Kinasen und „Stellglieder“ an diesen Signalwegen beteiligt sind, ist in vielerlei Hinsicht noch unzureichend erforscht. Ein entscheidender Faktor für die Regulation verschiedener Ionenporter ist die intrazelluläre Chlorid-Konzentration (Gamba, 2005). Ein Signalweg, der zwei Familien chloridsensitiver Kinasen umfasst, rückte in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung. Zu dieser Signalkaskade gehören die WNK-Kinasen auf der einen Seite und die Ste20-type Kinasen SPAK/OSR1 auf der anderen Seite. Von den drei in der Niere vorkommenden Vertreter der WNK-Kinasen sind WNK1 und 4 durch *in-vitro*- und *in-vivo*-Experimente bereits recht gut charakterisiert. Bezüglich der Beteiligung der WNK3-Kinase an der Regulation renaler Ionenporter existieren bislang nur *in-vitro*-Daten.

Diese *in-vitro*-Experimente legen den Verdacht nahe, dass WNK3 eine zentrale Rolle bei der Regulation des NKCC2-Transporters spielen könnte. Der im TAL lokalisierte Furosemid-sensitive NKCC2 ist ein Schlüsselement der Salzreabsorption an der Niere und steuert somit abhängig von seinem Aktivitätszustand grundlegend den Wasser- und Elektrolythaushalt (Gamba, 1999). Defekte des NKCC2 führen beim Menschen zu einer autosomal-rezessiven

Erbkrankheit, dem Bartter Syndrom Typ 1. Als pathognomonisch für diese Erkrankung gilt das Auftreten einer arteriellen Hypotonie trotz erhöhter Renin- und Aldosteronspiegel, einhergehend mit massivem Salzverlust, Hypokaliämie und metabolischer Alkalose (Simon et al., 1996a). In Experimenten in *Xenopus-laevis*-Oozyten konnte eine essentielle Beteiligung von WNK3 an der Regulation von NKCC2 nachgewiesen werden (Ponce-Coria et al., 2008; Rinehart et al., 2005). Dabei stellt WNK3 die chloridsensitive Komponente der Signalkaskade dar und führt über Phosphorylierung weiterer Kinasen zur Aktivierung von NKCC2. Eine solche Intermediärkinase, für die WNK3 ein spezifisches Bindungsmotiv in der carboxy-terminalen Domäne besitzt, ist die SPAK/OSR1-Kinase, welche bei der Signaltransduktion stromabwärts von WNK3 liegt. Intrazellulärer Chlorid-Mangel führte in *in-vitro*-Experimenten zur Aktivierung von WNK3 und SPAK/OSR1 und im Folgenden zu einer Phosphorylierung von NKCC2 an den N-terminalen Threoninen Thr-96 und Thr-101. Umgekehrt wirkten die Kinase-inaktiven Formen von WNK3 und SPAK inhibierend auf die NKCC2 Aktivität durch Dephosphorylierung (Ponce-Coria et al., 2008). Außerdem resultierte die Coexpression von NKCC2 mit WNK3 in Oozyten in einer gesteigerten Oberflächenexpression von NKCC2 (Rinehart et al., 2005). Darüber hinaus spielt WNK3 auch bei der Vasopressin-abhängigen Phosphorylierung und Aktivierung von NKCC2 eine zentrale Rolle (Gimenez and Forbush, 2003; Rinehart et al., 2005). WNK3 und SPAK sind also offensichtlich erforderlich, um die basale Aktivität von NKCC2 aufrechtzuerhalten.

In-vitro-Experimente verweisen zudem auf eine essentielle Bedeutung von WNK3 bei der Regulation des NCC. So wie im TAL NKCC2 eine entscheidende Schaltstelle für die Na-Resorption darstellt, ist im DCT die Aktivität des Thiazid-sensitiven NCC determinierend für die Reabsorptionskapazität (Gamba, 1999). Ähnlich wie bei NKCC2 ist auch für loss-of-function-Mutationen von NCC beim Menschen eine Erbkrankheit beschrieben worden, die symptomatisch durch Hypotonie, renalen Salzverlust und eine hypokaliämische Alkalose gekennzeichnet ist und die als Gitelman-Syndrom bezeichnet wird (Simon et al., 1996b). Analog zu NKCC2 steigert WNK3 auch bei NCC die Translokation zur apikalen Zellmembran und erhöht somit die Oberflächenexpression (Rinehart et al., 2005).

Darüber hinaus scheint der WNK3-Kinase auch eine Bedeutung bei der Regulation des Kaliumtransportes an der Niere zuzukommen. Beispielsweise

hatte WNK3 bei Experimenten in *Xenopus*-Oozyten eine inhibierende Wirkung auf KCC-Transporter (de Los Heros et al., 2006).

Die bislang von verschiedenen Arbeitsgruppen erhobenen Daten zu WNK3-abhängigen Signalwegen sind in Abb. 34 schematisch zusammengefasst. Insgesamt spielt die WNK3-Kinase offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Regulation renaler Iontentransporter. Alle Erkenntnisse, die bislang zu WNK3-assoziierten Mechanismen gewonnenen wurden, beruhen jedoch ausschließlich auf *in-vitro*-Modellen und lassen die Frage der tatsächlichen physiologischen Relevanz des Einflusses von WNK3 auf die Aktivität renaler Iontentransporter unbeantwortet.

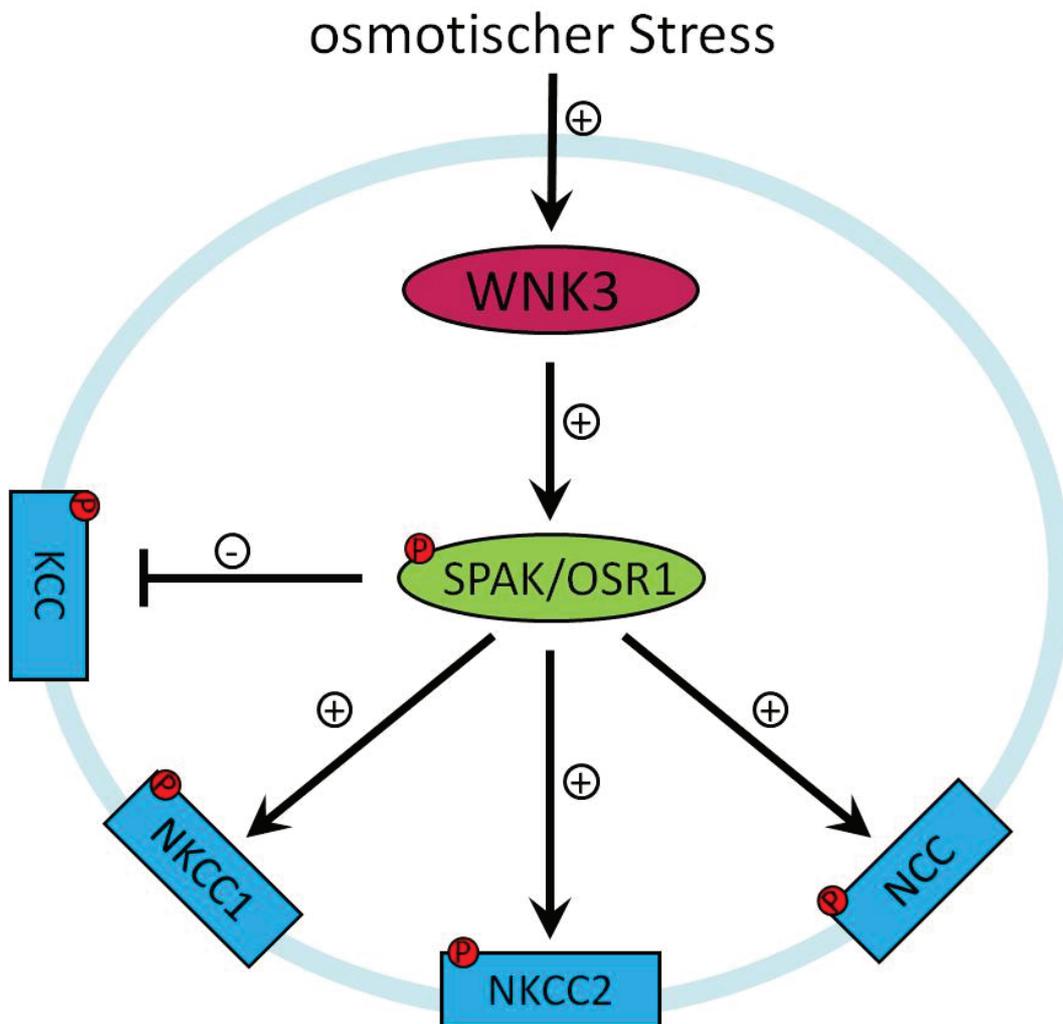


Abb. 34 Effekte von WNK3 auf Iontentransporter, soweit sie bislang aus *in-vitro*-Experimenten bekannt sind (modifiziert nach Richardson et Alessi, 2008)

2. Der renale Phänotyp der WNK3-KO-Maus

In der vorliegenden Arbeit wurden die durch einen Funktionsverlust der WNK3-Kinase hervorgerufenen phänotypischen Veränderungen, die die Nierenfunktion betreffen, anhand einer WNK3-KO-Maus-Linie charakterisiert. Es handelte sich hierbei um generell WNK3-defiziente Mäuse, deren Generierung durch die Insertion eines Gene-Trap-Targeting-Vektors in das Intron 5 des WNK3-Gens erfolgte. Die bereits beschriebenen *in-vitro*-Daten legen den Verdacht nahe, dass der WNK3-Kinase auch *in vivo* eine wichtige Bedeutung bei der Regulation renaler Ionentransporter und damit bei der Steuerung von an der Niere stattfindenden Reabsorptionsprozessen zukommt. Eine pathologisch reduzierte Funktion renaler Ionentransporter resultiert, wie beispielsweise die Hemmung von NKCC2 oder NCC mittels Diuretika zeigt, in einer massiv gesteigerten Natriuresis und Diuresis. Dies führte zu der Hypothese, dass ein Funktionsverlust der WNK3-Kinase mit einer pathologisch veränderten Funktion renaler Ionentransporter einhergehen könnte. Dies würde eine Beeinträchtigung der renalen Konzentrationsfähigkeit nach sich ziehen und möglicherweise sogar in einem Bartter-Syndrom-ähnlichen Phänotyp mit massivem Salzverlust resultieren (Ponce-Coria et al., 2008). Daher wurden an den WNK3-KO-Mäusen Experimente zur Evaluierung der Nierenfunktion und der davon abhängigen Konsequenzen für die Salz-, Wasser- und Blutdruckhomöostase durchgeführt.

2.1 Blutdruck und Nierendurchblutung

Die Regulation des Blutdruckes steht in engem Zusammenhang mit der Wasser- und Elektrolythomöostase, welche wiederum essentiell von den entsprechenden Reabsorptionsvorgängen an der Niere abhängt. Die bereits beschriebenen *in-vitro*-Daten zeigen, dass WNK3 durch dynamischen Wechsel zwischen aktivem und inaktivem Status die renale NaCl-Resorption aktivieren bzw. hemmen kann. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass ein Funktionsverlust der WNK3-Kinase möglicherweise in pathologischen Veränderungen des Blutdruckes resultieren könnte.

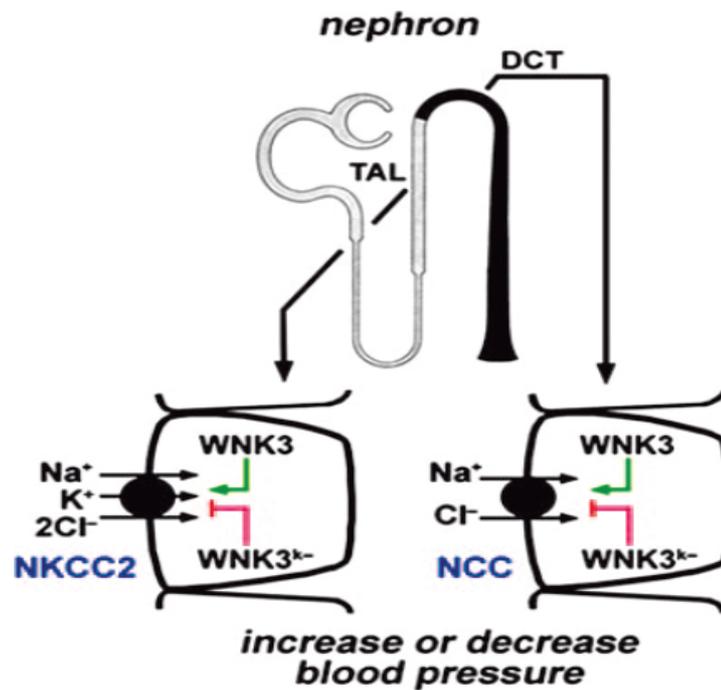


Abb. 35 WNK3-abhängige Modulationen renaler Ionentransporter wie NKCC2 und NCC sind potentielle Mechanismen der Blutdruckregulation (Rinehart et al., 2005).

Daher stellte die Messung des Blutdruckes einen der wichtigsten Basiswerte bei der Untersuchung des Phänotyps der WNK3-defizienten Mäuse dar. Jedoch konnte im Gegensatz zu der dargelegten Hypothese keine Veränderung des Blutdruckes bei den WNK3-KO-Mäusen festgestellt werden. Sowohl der systolische Blutdruck als auch das Blutvolumen waren vergleichbar mit den bei den Wildtypen gemessenen Werten, so dass offensichtlich die physiologische Aufrechterhaltung der Blutdruckhomöostase bei den WNK3-defizienten Mäusen gewährleistet ist. In diesem Zusammenhang wurde auch determiniert, ob Veränderungen hinsichtlich der Nierendurchblutung festzustellen sind. Säugetiernieren sind mit 20-25% des Herzminutenvolumens sehr stark durchblutet. Beim Menschen beträgt der renale Blutfluss (RBF) demzufolge etwa 1200 ml/min, bei der Maus circa 1,5 ml/min. Diese hohe Flussrate beeinflusst wesentlich den effektiven Filtrationsdruck und die glomeruläre Filtrationsrate und ist somit entscheidend für die an der Niere stattfindenden Ausscheidungs- und Regulationsprozesse (Engelhardt und Breves, 2005; Klinke und Silbernagl, 2001). Alle erhobenen Befunde hinsichtlich der Nierendurchblutung, zu deren Beurteilung der renale Blutfluss, die glomeruläre Filtrationsrate und der renale vaskuläre Widerstand herangezogen wurden, waren bei den WNK3-KO-Mäusen im physiologischen Bereich.

2.2 Nierenfunktion und Elektrolytresorption

Wenn die anhand der *in-vitro*-Experimente beschriebenen Signalwege auch *in vivo* eine wichtige Rolle spielen, müsste sich das Fehlen WNK3-abhängiger Regulationsmechanismen in Veränderungen der Aktivität renaler Ionentransporter manifestieren. Als Parameter für derartige pathologische Prozesse wurden zunächst Basalwerte hinsichtlich der Urinosmolarität, des Urinvolumens und des Elektrolytstatus erhoben. Dabei wurden möglichst große Gruppengrößen (z.T. über 40 Tiere) gewählt, um auch kleinere Abweichungen von den Normwerten zuverlässig detektieren zu können. Jedoch lagen alle gemessenen Werte im Referenzbereich und waren vergleichbar mit denen der Kontrolltiere. Um zu evaluieren, ob besonders hohe Anforderungen an den renalen Konzentrierungsmechanismus möglicherweise zu einer Überschreitung der maximalen Reabsorptionskapazität der WNK3-KO-Mäuse führen, wurden Urinosmolaritäten auch nach 48-stündiger Wasserrestriktion bestimmt. Auch dieses Experiment lieferte keine Hinweise auf eine mangelnde Konzentrierungsfähigkeit, die bedingt durch den Funktionsverlust der WNK3-Kinase zu vermuten war. Somit ergab sich kein funktioneller Hinweis auf eine gestörte Nierenfunktion bei den WNK3-defizienten Tieren.

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System trägt essentiell zur Regulation der NaCl-Resorption und damit auch des Blutdruckes bei und stellt einen sensitiven Parameter für Veränderungen der an der Niere stattfindenden Reabsorptionsprozesse dar (Castrop et al., 2010). Die in diesem Zusammenhang ermittelten Plasmakonzentrationen von Renin und Aldosteron waren bei den WNK3-KO-Mäusen nicht auffällig. Offensichtlich besteht bei den WNK3-KO-Mäusen also keine Beeinträchtigung der Wasser- und Elektrolytreabsorption an der Niere.

2.3 Nidrigsalzversuche

Versuche mit speziellen Diäten dienen in der Regel dazu, die maximale Stoffwechselleistung bzw. Kompensationsfähigkeit eines Organs zu testen. Um die physiologische Aufrechterhaltung der Nierenfunktion zu prüfen, kommen dabei in erster Linie Futtermittel mit einem eklatanten Überschuss bzw. Mangel wichtiger Elektrolyte wie Natrium oder Kalium zum Einsatz. Bei gesunden Wildtypmäusen führt zumindest der kurzzeitige Einsatz solcher Diäten nicht zu signifikanten Veränderungen der Salz- und Wasserhomöostase, während es bei

KO-Modellen unter diesen speziellen Bedingungen zur Entstehung eines unkompensierten Zustandes kommen kann, wenn beispielsweise die maximale Reabsorptionskapazität der Niere überschritten wird. Auch im Zusammenhang mit Mausmodellen, die die Erforschung WNK-abhängiger Signalwege betrifft, lassen sich interessante Resultate aus derartigen Experimenten ableiten. Beispielsweise zeigten KS-WNK1-transgene Mäuse bei Na-armer-Diät im Vergleich zum Wildtyp eine gesteigerte Natriumexkretion im Urin (Liu et al., 2011). Die gleiche Arbeitsgruppe führte auch Versuche mit KS-WNK1-KO-Mäusen durch und konnte im Umkehrschluss bei Na-Überschuss im Futter eine unzureichend angepasste Natriumexkretion im Urin einhergehend mit einem Anstieg des systolischen Blutdruckes nachweisen. Immunhistochemische Färbungen bestätigten, dass KS-WNK1 offensichtlich ein negativer Regulator von NCC und NKCC2 ist, was jedoch nur unter gesteigerten Anforderungen an die Natriumreabsorption zu klinisch manifesten Problemen führt (Liu et al., 2011). Heterozygote WNK1-Mäuse hingegen zeigten bei Fütterung einer salzarmen Diät keinerlei Beeinträchtigung der Fähigkeit zur Urinkonzentrierung. Zumindest eine WNK1-Haploinsuffizienz scheint also die Reabsorption von Elektrolyten nicht wesentlich zu beeinträchtigen (Zambrowicz et al., 2003). Bei einem Modell mit SPAK-knock-in-Mäusen, bei denen durch entsprechende Modifikation die Aktivierung von SPAK durch WNK-Kinasen unterbunden wurde, konnten eine salzsensitive Hypotonie sowie eine unzureichende Anpassung der Salzreabsorption beim Wechsel von Na-reicher auf Na-arme Diät nachgewiesen werden (Rafiqi et al., 2010). Die beschriebenen Daten zeigen, dass die Steuerung der Salzreabsorption an der Niere durch WNK-Kinasen essentiell vom Elektrolytstatus der Versuchstiere abhängt. Daher wurden auch bei den hier untersuchten WNK3-KO-Mäusen wichtige Parameter der Nierenfunktion unter Niedrigsalzbedingungen determiniert. Um den Salzverlust zuverlässig zu induzieren, erhielten die Versuchstiere bei Beginn des Fütterungsversuches eine einmalige Furosemid-Injektion (40mg/kg) und ab diesem Zeitpunkt das Na-arme Futter für die Dauer von einer Woche. Danach wurden wie unter Basalbedingungen das Urinvolumen, die Urinosmolarität, die wichtigsten Plasmaelektrolyte (Na, K, Ca und Cl), die Plasmarenin- und Plasmaaldosteronkonzentrationen sowie die Exkretion von Natrium und Kalium im Urin bestimmt. Alle gemessenen Parameter waren jedoch unauffällig und lieferten keinen Anhaltspunkt für eine pathologische Veränderung der

Salzreabsorptionskapazität bei den WNK3-KO-Mäusen.

2.4 Zusammenfassung des renalen Phänotyps der WNK3-KO-Maus

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei den an WNK3-KO-Mäusen durchgeführten *in-vivo*-Experimenten im Gegensatz zu unseren Erwartungen kein relevanter renaler Phänotyp detektiert werden konnte. Ein Funktionsverlust der WNK3-Kinase hat also augenscheinlich keinerlei funktionelle Konsequenzen. Dieser Befund scheint angesichts der sehr aussagekräftigen *in-vitro*-Datenlage, die auf den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen beruht und unzweifelhaft eine Beteiligung der WNK3-Kinase an der Regulation renaler Iontentransporter demonstriert, eher erstaunlich. Für dieses Ergebnis sind grundsätzlich zwei Erklärungen denkbar: Zum einen wäre es möglich, dass die WNK3-Kinase bei der Modulation der Aktivität renaler Iontentransporter *in vivo* nur eine untergeordnete Rolle spielt. In diesem Fall wären entweder die in der Niere exprimierte Level oder die Aktivität von WNK3 in der Niere zu niedrig, um den renalen Salztransport beeinflussen zu können. Dies würde allerdings zugleich implizieren, dass die Expression von WNK3 bei den bereits beschriebenen *in-vitro*-Experimenten in *Xenopus* Oozyten auf einem unphysiologisch hohen Level erfolgte. Zum anderen könnten alternative Signalwege den Funktionsverlust der WNK3-Kinase kompensieren. Der fehlende Einfluss von WNK3 würde dabei zu kompensatorischen Veränderungen weiterer Komponenten führen, die am Netzwerk zur Regulation der Aktivität renaler Transportprozesse beteiligt sind.

3. Kompensationsmechanismen bei der WNK3-KO-Maus

Aufgrund der Tatsache, dass die in der Niere vorkommenden WNK-Kinasen miteinander in Interaktion treten, um den Salz- und Wassertransport zu regulieren (Hoorn et al.; McCormick and Ellison; Richardson and Alessi, 2008), sind die anderen in der Niere exprimierte Vertreter dieser Familie, WNK1 und WNK4, interessante potentielle Kandidaten für eine Kompensation des Fehlens der WNK3-Funktion.

3.1 Kompensatorische Hochregulation der WNK1-Expression

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden die Expressionslevel von WNK1 und WNK4 in der Niere von Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen detektiert. Während

die WNK4-mRNA-Expression bei beiden Genotypen vergleichbar war, konnte für die WNK1-Kinase eine deutliche Hochregulation gegenüber den Kontrolltieren sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. WNK1 steigert *in vitro* ebenso wie WNK3 die Aktivität von NKCC2 (Richardson and Alessi, 2008) und NCC (Moriguchi et al., 2005; Rinehart et al., 2005; Vitari et al., 2005; Yang et al., 2007b). Beide Kinasen wirken dagegen inhibierend auf den Kaliumtransport durch Hemmung der KCC-Funktion (de Los Heros et al., 2006) und der ROMK-Aktivität (Fang et al., 2009; Leng et al., 2006). Somit ist eine Kompensation der fehlenden WNK3-Funktion durch eine erhöhte WNK1-Expression ein plausibel erscheinender Mechanismus.

3.2 Die WNK1-SPAK/OSR1-Achse

Die meisten der WNK-abhängigen Effekte werden über Intermediärkinasen vermittelt. Ein gut erforschter Signalweg, für dessen Relevanz sowohl *in vitro* (Moriguchi et al., 2005; Ponce-Coria et al., 2008; Richardson et al., 2008; Vitari et al., 2005) als auch *in vivo* (Yang et al., 2010) bereits Beweise erbracht werden konnten, ist die Regulation renaler Ionentransporter über die SPAK/OSR1-Signalkaskade. Sowohl die Effekte von WNK1 als auch von WNK3 an der Niere werden in vielen Fällen über diesen Signalweg vermittelt. Die kompensatorische Erhöhung der WNK1-Expression ließ vermuten, dass auch die Level von SPAK/OSR1 dadurch beeinflusst sein könnten. Unter basalen Bedingungen konnte dies nicht bestätigt werden, jedoch zeigten immunhistochemische Färbungen eine gesteigerte SPAK/OSR1-Expression bei WNK3-KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp unter salzarmen Bedingungen. Dies bestätigte die Ergebnisse früherer Studien, die ebenfalls einen Zusammenhang der SPAK/OSR1-Expression mit der oralen Salzzufuhr postulierten (Chiga et al., 2008). Der kompensatorische Mechanismus bei den WNK3-defizienten Tieren dürfte also demnach über den WNK1-SPAK/OSR1 Signalweg verlaufen.

3.3 Regulation renaler Ionentransporter in Abhängigkeit von der WNK1-SPAK/OSR1-Achse

3.3.1 Expressionslevel renaler Ionentransporter: Immunhistochemie

Abhängig von der WNK1-SPAK/OSR1-Achse wird in der Niere die Aktivität von Ionentransportern und somit die Salz- und Wasserresorption moduliert. Um zu verifizieren, ob die veränderten Expressionslevel der genannten Proteinkinasen

bei den WNK3-KO-Mäusen auch Auswirkungen auf die Aktivität dieser Ionenporter haben, wurde als nächster Schritt in immunhistochemischen Färbungen die Expression renaler Ionenporter, die essentiell an der Na-Resorption beteiligt sind, detektiert. Interessanterweise ergab sich dabei ein zu den für WNK1 und für SPAK/OSR1 erhobenen Befunden analoges Muster. Unter basalen Bedingungen waren die Expressionslevel der untersuchten Ionenporter NCC und NKCC2 vergleichbar niedrig bei Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen. Unter Niedrigsalzbedingungen jedoch wurden die aktivierten Formen pNCC und pNKCC2 signifikant stärker bei den WNK3-KO-Mäusen als bei den Kontrolltieren exprimiert. Zudem zeigte sich auch ein verstärktes Trafficking zur apikalen Zellmembran. Ein weiterer Ionenporter, der von WNK1, jedoch SPAK/OSR1-unabhängig reguliert wird, ist der in Verbindungstubulus und Sammelrohr exprimierte ENaC. Hier konnten jedoch immunhistochemisch keine Unterschiede zwischen WNK3-KO- und Wildtypmäusen nachgewiesen werden. Die Relevanz dieses Signalweges für die Kompensation der fehlenden WNK3-Funktion scheint also fraglich.

3.3.2 Funktionelle Untersuchung renaler Ionenporter durch spezifische Inhibition

Um die funktionellen Konsequenzen der auf mRNA- und Proteinlevel erhobenen Daten zu klären, wurden Diuretika zur gezielten Hemmung von NCC, NKCC2 und ENaC eingesetzt. Die Ergebnisse bestätigten die bisherigen Befunde: Sowohl HCT (NCC-Inhibitor) als auch Furosemid (NKCC2-Inhibitor) führten unter basalen Bedingungen bei beiden Genotypen zu einer vergleichbar starken Diurese. Nach salzarmer Diät hingegen war die Urinkonzentrierung nach HCT-Injektion bei den WNK3-KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp deutlich vermindert und die gemessenen Urinvolumina überstiegen bei den WNK3-KO-Mäusen die Werte der Basalversuche. Eine Hemmung von ENaC mit Amilorid führte hingegen zu keiner funktionellen Beeinträchtigung, was den Verdacht untermauert, dass ENaC nicht zu den genannten Kompensationsmechanismen beizutragen scheint. Insgesamt wirkt also offensichtlich eine Intensivierung des WNK1-SPAK/OSR1-Signalweges dem WNK3-Funktionsverlust durch gesteigerte Aktivierung von NCC und NKCC2 kompensierend entgegen. Diese Kompensationsmechanismen kommen jedoch augenscheinlich nur zum Tragen, wenn eine die basale Funktion übersteigende renale Reabsorptionskapazität erforderlich ist und waren bei den

durchgeführten Experimenten somit nur unter Niedrigsalzbedingungen nachweisbar.

3.4 Funktion der WNK1-Isoformen in der Niere

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, existieren zwei wichtige Isoformen der WNK1-Kinase: Ein ubiquitär exprimiertes, langes Transkript (L-WNK1) und eine verkürzte, ausschließlich in der Niere vorkommende Form (KS-WNK1) (Xu et al., 2002). Beide Isoformen sind entscheidend an der Regulation der renalen Ionentransporter beteiligt und entfalten dabei sowohl direkte als auch indirekte Wirkungen durch Interaktion untereinander und mit den anderen WNK-Kinasen (Hoon et al.; Richardson and Alessi, 2008). Beispielsweise aktiviert L-WNK1 NCC und NKCC2, während KS-WNK1 diese Ionenkanäle indirekt durch Hemmung der WNK1-Funktion beeinflusst (Liu et al., 2011). Zudem wirkt KS-WNK1 inhibierend auf WNK3 bei der Phosphorylierung und Aktivierung von NCC (Hadchouel et al., 2010). Da bei den WNK3-KO-Mäusen NCC und NKCC2 WNK1-abhängig verstärkt aktiviert werden, liegt also die Vermutung nahe, dass insbesondere bei einer erforderlichen Steigerung der renalen Reabsorptionsprozesse unter salzarmen Bedingungen der aktivierende Effekt von L-WNK1 auf NCC und NKCC2 im Vergleich zur inhibierenden Wirkung von KS-WNK1 überwiegt. Insgesamt scheint also der Netto-Effekt der kompensatorisch gesteigerten WNK1-Signalkaskade bei den WNK3-KO-Mäusen ein stimulatorischer zu sein. Derartige Mechanismen sind bereits aus Experimenten mit heterozygoten WNK1-Mäusen bekannt, die eine Hypotonie entwickelten (Zambrowicz et al., 2003). Diese Daten stützen offensichtlich die Hypothese, dass die Effekte von L-WNK1 und KS-WNK1 in der Summe den Ionentransport in der Niere aktivieren. Jedoch soll an dieser Stelle auch erwähnt werden, dass bei einem weiteren Stamm heterozygoter Mäuse, der von einer anderen Arbeitsgruppe generiert wurde, keinerlei Auffälligkeiten bezüglich des Blutdrucks nachgewiesen werden konnten (Susa et al., 2012). Diese Disparitäten deuten darauf hin, dass beispielsweise der genetische Hintergrund des jeweiligen Mausstammes Einfluss auf die Ausprägung und die Kapazität etwaiger Kompensationsmechanismen haben könnte.

4. Das Netzwerk der WNK-Kinasen in der Niere

Das Zusammenspiel der WNK-Kinasen in der Niere stellt in mehrfacher Hinsicht ein komplexes Netzwerk dar. Zum einen interagieren WNK1, 3 und 4 bei der Regulation renaler Ionentransporter, zum anderen sind bereits diverse Mechanismen bekannt, die auf eine „Kreuzregulation“ der WNK-Kinasen untereinander hinweisen. Potentielle Zielelemente, die über die WNK-SPAK/OSR1-Signalkaskade reguliert werden, sind diverse Ionentransporter in der Niere, u.a. NKCC1, NKCC2, KCC, NCC, ENaC und ROMK. Die am besten charakterisierten Substrate für die WNK-SPAK/OSR1-Achse sind die Ionentransporter NKCC2 und NCC, die im TAL bzw. im DCT die entscheidenden Elemente für die Na-Resorption darstellen.

An der Regulation von NKCC2 sind alle drei in der Niere vorkommenden WNK-Kinasen beteiligt. WNK1 steigert hierbei die Aktivität von NKCC2 durch Phosphorylierung und Aktivierung von SPAK/OSR1 als Intermediärkinasen, was wiederum zu einer Aktivierung von NKCC2 sowie einer vermehrten Translokation zur apikalen Zellmembran führt (Huang et al., 2008; Moriguchi et al., 2005; Richardson et al., 2011). Vergleichbare Wirkungen auf die NKCC2-Aktivität konnten *in vitro* auch für WNK3 und WNK4 nachgewiesen werden, wobei wiederum SPAK/OSR1 in den Signalweg involviert zu sein scheinen (Moriguchi et al., 2005; Ponce-Coria et al., 2008; Richardson and Alessi, 2008; Vitari et al., 2005). KS-WNK1 hingegen wirkt vermutlich indirekt inhibierend auf die NKCC2-Aktivität, was durch Antagonisierung der Effekte von L-WNK1 vermittelt werden könnte. KS-WNK1 stellt also gewissermaßen einen negativen Regulator für die von L-WNK1 vermittelten Effekte dar (Liu et al., 2011).

Auch für die Regulation von NCC durch WNK-Kinasen sind bereits wichtige Mechanismen identifiziert worden. Diese sind klinisch von besonderem Interesse, da bei Patienten, die an der Erbkrankheit FHt leiden, durch Therapie mit Thiaziden, welche NCC hemmen, eine deutliche Besserung der Nierensymptomatik erzielt werden kann. Sowohl *in-vitro*- als auch *in-vivo*-Daten stützen die Hypothese, dass FHt ätiologisch mit Mutationen von WNK4 assoziiert werden kann (Lalioi et al., 2006; San-Cristobal et al., 2009; Yang et al., 2007b; Yang et al., 2007c). *In-vitro*-Daten lassen folgenden Mechanismus für die Regulation von NCC durch die WNK-Kinasen in der Niere vermuten: WNK4 wirkt inhibierend auf die NCC-Aktivität (Cai et al., 2006; Golbang et al., 2006;

Subramanya et al., 2009; Yang et al., 2003), wohingegen WNK3 antagonistische Effekte entfaltet. WNK3 steigert also die NCC-Aktivität und tritt dabei in direkte Interaktion mit WNK4 (Rinehart et al., 2005; Yang et al., 2007b). WNK1 scheint ebenso wie WNK3 direkt aktivierend zu wirken und entfaltet darüber hinaus indirekte Effekte durch Hemmung der WNK4-Funktion (Moriguchi et al., 2005; Vitari et al., 2005; Yang et al., 2003). KS-WNK1 könnte - wie schon für NKCC2 erläutert - eine inhibierende Funktion durch Hemmung der langen Isoform von WNK1 besitzen (Liu et al., 2011). An allen genannten Prozessen, die die Aktivität von NKCC2 und NCC in der Niere steuern, scheinen SPAK und OSR1 als wichtige Intermediärkinasen beteiligt zu sein (Moriguchi et al., 2005; Richardson et al., 2008; Richardson et al.; Vitari et al., 2005).

Wie an diesen Beispielen deutlich wird, sind die WNK-abhängigen Effekte auf vielfache Weise miteinander verknüpft. Daher sollte ein solcher Signalweg nicht als isolierter Prozess, sondern nur im Zusammenhang und unter Berücksichtigung des gesamten Gefüges betrachtet werden. Dies stützt nachdrücklich die These, dass der Verlust der WNK3-Funktion durch eine entsprechend angepasste WNK1-Aktivität so kompensiert werden kann, dass bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten KO-Mauslinie kaum funktionelle Defizite zum Tragen kommen.

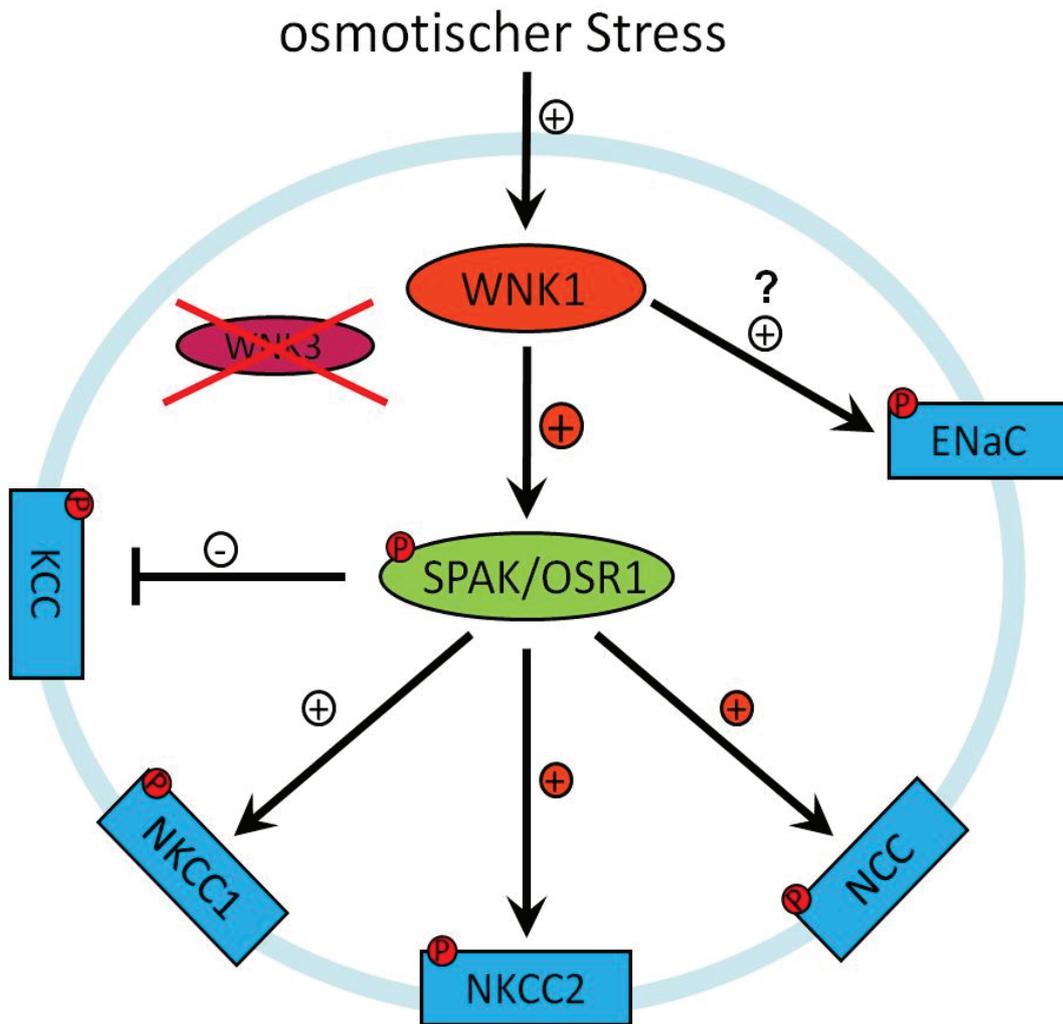


Abb. 36 Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entwickelter Kompensationsmechanismus des WNK3-Funktionsverlustes durch die WNK1-SPAK/OSR1-Achse (modifiziert nach Richardson et Alessi, 2008)

Zusammenfassend führen die erhobenen Daten zu dem Ergebnis, dass die Relevanz der WNK3-Kinase für den Elektrolyttransport an der Niere limitiert zu sein scheint. Vielmehr dürfte WNK3 *in vivo* eine Komponente eines Netzwerks von Kinasen mit regulatorischer Funktion darstellen, das das „Feintuning“ tubulärer Reabsorptionsprozesse steuert. Somit kann ein Verlust der WNK3-Funktion offensichtlich weitestgehend ohne pathologische Beeinträchtigungen kompensiert werden. An diesen Mechanismen scheint essentiell die WNK1-SPAK-OSR1-Signalkaskade beteiligt zu sein.

5. **Ausblick: Relevanz von WNK3 bei humanen Patienten**

Erste Hinweise, welche Rolle die WNK3-Kinase beim Menschen spielen könnte, gibt eine aktuelle Studie über Autismuspatienten. In dieser Studie wurde eine Mikrodeletion auf dem X-Chromosom (Xp11.22) beschrieben, die mehrere Gene (unter anderem WNK3) betrifft und mit Autismus und anderen kognitiven Dysfunktionen in Zusammenhang stehen könnte (Qiao et al., 2008). Ob WNK3 tatsächlich kausal in die Entstehung dieser Krankheitsbilder involviert ist, ist bislang noch unklar. Für eine ätiologische Rolle von WNK3 sprechen *in-vitro*-Experimente, die auf eine Beteiligung von WNK3 an der Steuerung des Erregungszustandes GABA-assoziiierter Neurone verweisen (Kahle et al., 2005). Interessanterweise war bei Patienten, bei denen die Mikrodeletion Xp11.22 nachgewiesen werden konnte, die Nierenfunktion nicht beeinträchtigt, was einen ersten Anhaltspunkt dafür darstellen könnte, dass ein Funktionsverlust der WNK3-Kinase auch beim Menschen ohne funktionelle Beeinträchtigung der renalen Reabsorptionsprozesse kompensiert werden kann.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung neuer Strategien zur Therapie der Hypertonie, die in den Industrieländern ein weit verbreitetes Problem darstellt, ist trotz des medizinischen Fortschritts nach wie vor ein zentrales Forschungsthema. Bislang erfolgen viele Therapieansätze rein symptomatisch und nicht auf ätiologischer Ebene. Ein Grund hierfür ist die unzureichende Kenntnis der physiologischen und pathologischen Mechanismen, die der Blutdruckregulation zugrunde liegen. Von essentieller Bedeutung sind hierbei die Reabsorptionsprozesse der Niere, die die Wasser- und Elektrolythomöostase und damit letztlich auch den Blutdruck modulieren. Ein vielversprechender Forschungsansatz beschäftigt sich in diesem Zusammenhang mit der Familie der sogenannten WNK-Kinasen (= with no K-Kinases), deren gemeinsames charakteristisches Merkmal die namensgebende Substitution eines Lysinrestes durch Cystein in Untereinheit II der katalytischen Domäne darstellt. Bei Säugetieren existieren insgesamt vier WNK-Kinasen, von denen drei (WNK1, 3 und 4) in der Niere exprimiert werden. Während die Funktionen von WNK1 und 4 bereits recht gut charakterisiert sind und auch anhand von *in-vivo*-Experimenten ein Zusammenhang mit pathologischen Zuständen wie beispielsweise dem Pseudohypoaldosteronismus Typ II nachgewiesen werden konnte, existieren aufgrund des Fehlens geeigneter Tiermodelle zur WNK3-Kinase bislang nur *in-vitro*-Daten aus Experimenten in *Xenopus*-Oozyten. Diese Ergebnisse verweisen auf eine wichtige Rolle von WNK3 als chloridsensitive Kinase bei der Aktivierung renaler Ionentransporter wie NKCC2 oder NCC. Dies legt die Frage nahe, welche Bedeutung der WNK3-Kinase *in vivo* bei der Wasser- und Elektrolythomöostase und der Blutdruckregulation zukommt. Um dies zu klären, wurden in der vorliegenden Arbeit Experimente zur Evaluierung von Nierenfunktion und Blutdruckhomöostase bei einer mittels Gen-Targeting generierten WNK3-defizienten Mauslinie durchgeführt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei den WNK3-KO-Mäusen entgegen der dargelegten Hypothese kein relevanter Phänotyp detektiert werden konnte. Alle Parameter hinsichtlich des Blutdrucks, der Nierendurchblutung und der Konzentrationsfähigkeit der Niere, sowie glomeruläre Filtrationsrate, Urinosmolarität oder Plasma- und Urinelektrolyte waren bei den WNK3-defizienten Mäusen unauffällig und lagen

im Normbereich. Die daraus resultierende Hypothese, dass die fehlende WNK3-Kinase-Funktion durch andere Signalwege kompensiert werden könnte, ergab jedoch positive Befunde. Eine signifikante Hochregulation der WNK1-Kinase-Expression bei den WNK3-KO-Mäusen, die unter Salzrestriktion mit gesteigerten Expressionsleveln der Intermediärkinasen SPAK/OSR1 und renaler Ionenporter wie NKCC2 und NCC einherging, führte zu der These, dass bei den WNK3-defizienten Mäusen ein über die WNK1-SPAK/OSR1-Achse verlaufender Kompensationsmechanismus zu existieren scheint. Die Bedeutung der WNK3-Kinase für den Elektrolyttransport an der Niere scheint somit limitiert zu sein und sollte vielmehr als Teil eines Netzwerks von Kinasen mit regulatorischer Funktion gesehen werden, das das „Feintuning“ tubulärer Reabsorptionsprozesse steuert. Eine aktuelle Studie an Autismuspatienten, bei denen eine Mikrodeletion, die unter anderem das WNK3-Gen betrifft, nachgewiesen werden konnte, lieferte erste Hinweise, dass auch beim Menschen die WNK3-Kinase bei der Regulation renaler Reabsorptionsprozesse eine eher untergeordnete Rolle spielen dürfte.

VIII. SUMMARY

Hypertension prevalence is high in industrialized countries and therefore blood pressure regulation is a key subject of research. Nevertheless, the development of therapeutic strategies is comparatively slow, mostly because of difficulties in identifying physiological and pathological mechanisms of blood pressure homeostasis. Thus, the understanding of etiological principles of hypertension requires further investigation. An important mechanism contributing to blood pressure regulation is the water and electrolyte reabsorption in the kidney, determined by the function of renal ion transporters. The activity of renal ion transporters and channels is regulated by different kinases. *In vitro* data suggest that the family of WNK (= with no K) kinases crucially contributes to the regulation of renal transepithelial ion transport. Four mammalian WNK-Kinases (WNK1-4) exist and three of them are expressed in the kidney (WNK 1, 3, and 4). The function of WNK1 and 4 is well-characterized and mutations of these kinases were shown to be involved in human diseases like pseudohypoaldosteronism type II. In contrast to WNK1 and WNK4 there are no data in terms of the physiological role of WNK3 to date because of the lack of a suitable animal model. *In vitro* experiments using the *Xenopus* oocytes expression system, however, demonstrated that WNK3 is a chloride-sensitive kinase, which is regulated by hyperosmotic and hypotonic conditions. Furthermore, WNK3 *in vitro* acts as a positive regulator of renal ion cotransporters like NKCC2 and NCC. The evaluation of WNK3 function *in vivo* has been hampered by the lack of pharmacological tools to specifically inhibit this kinase. The aim of this study was to determine the role of WNK3-kinase in the regulation of salt-, water- and blood pressure homeostasis. To investigate the renal function of WNK3 *in vivo*, a WNK3-deficient mouse strain was generated by means of gene targeting. Blood pressure, renal blood flow and parameters of urinary concentrating ability such as glomerular filtration rate, urine osmolarity or plasma and urine electrolytes were similar in WNK3 deficient mice and wild type littermates. All together, no obvious renal phenotype was detected in WNK3-KO-mice. Given the complex interplay among various WNK kinases in the kidney, we addressed changes in the expression levels of WNK kinases other than WNK3, because these other kinases may functionally compensate for the loss of WNK3 in the knockout mouse strain.

In accordance with this hypothesis the abundance of WNK1mRNA and protein were markedly upregulated in WNK3-KO mice. Furthermore, the induction of WNK1 in WNK3-deficient mice was paralleled by an increased abundance of the intermediate kinases SPAK/OSR1 and the renal ion cotransporters NKCC2 and NCC. In summary, the overall relevance of WNK3 for regulation of renal reabsorption of NaCl appears to be limited and can be largely compensated for by activation of WNK3-independent pathways, including the WNK1-SPAK/OSR1 axis. Consequently, WNK3 *in vivo* may serve as a member of a kinase network that facilitates a fine-tuning of renal transepithelial NaCl transport. Recently, results from a study in patients with autistic disorder associated with a microdeletion involving the WNK3 gene suggested, that WNK3 is also dispensable in humans for kidney function or can be compensated for by other regulatory mechanisms.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Adragna, N.C., Chen, Y., Delpire, E., Lauf, P.K., and Morris, M. (2004a). Hypertension in K-Cl cotransporter-3 knockout mice. *Adv Exp Med Biol* 559, 379-385.

Adragna, N.C., Di Fulvio, M., and Lauf, P.K. (2004b). Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes. *J Membr Biol* 201, 109-137.

Amlal, H., Paillard, M., and Bichara, M. (1994). Cl(-)-dependent NH₄⁺ transport mechanisms in medullary thick ascending limb cells. *Am J Physiol* 267, C1607-1615.

Ardailou, R. (1999). Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol* 10 *Suppl* 11, S30-39.

Bevan, S., and Andersson, D.A. (2009). TRP channel antagonists for pain--opportunities beyond TRPV1. *Curr Opin Investig Drugs* 10, 655-663.

Brautbar, N., Levi, J., Rosler, A., Leitesdorf, E., Djaldeti, M., Epstein, M., and Kleeman, C.R. (1978). Familial hyperkalemia, hypertension, and hyporeninemia with normal aldosterone levels. A tubular defect in potassium handling. *Arch Intern Med* 138, 607-610.

Breuil, V., Ticchioni, M., Testa, J., Roux, C.H., Ferrari, P., Breitmayer, J.P., Albert-Sabonnadiere, C., Durant, J., De Perreti, F., Bernard, A., *et al.* (2010). Immune changes in post-menopausal osteoporosis: the Immunos study. *Osteoporos Int* 21, 805-814.

Cai, H., Cebotaru, V., Wang, Y.H., Zhang, X.M., Cebotaru, L., Guggino, S.E., and Guggino, W.B. (2006). WNK4 kinase regulates surface expression of the human sodium chloride cotransporter in mammalian cells. *Kidney Int* 69, 2162-2170.

Cantley, L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.

Castaneda-Bueno, M., Cervantes-Perez, L.G., Vazquez, N., Uribe, N., Kantesaria, S., Morla, L., Bobadilla, N.A., Doucet, A., Alessi, D.R., and Gamba, G. (2012) Activation of the renal Na⁺:Cl⁻ cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 7929-7934.

Castrop, H. (2007). Mediators of tubuloglomerular feedback regulation of glomerular filtration: ATP and adenosine. *Acta Physiol (Oxf)* 189, 3-14.

Castrop, H., Hocherl, K., Kurtz, A., Schweda, F., Todorov, V., and Wagner, C. (2010) Physiology of kidney renin. *Physiol Rev* 90, 607-673.

Castrop, H., Lorenz, J.N., Hansen, P.B., Friis, U., Mizel, D., Oppermann, M., Jensen, B.L., Briggs, J., Skott, O., and Schnermann, J. (2005). Contribution of the basolateral isoform of the Na-K-2Cl⁻ cotransporter (NKCC1/BSC2) to renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 289, F1185-1192.

Castrop, H., and Schnermann, J. (2008). Isoforms of renal Na-K-2Cl cotransporter NKCC2: expression and functional significance. *Am J Physiol Renal Physiol* 295, F859-866.

Chen, S.Y., Bhargava, A., Mastroberardino, L., Meijer, O.C., Wang, J., Buse, P., Firestone, G.L., Verrey, F., and Pearce, D. (1999). Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2514-2519.

Chiga, M., Rai, T., Yang, S.S., Ohta, A., Takizawa, T., Sasaki, S., and Uchida, S. (2008). Dietary salt regulates the phosphorylation of OSR1/SPAK kinases and the sodium chloride cotransporter through aldosterone. *Kidney Int* 74, 1403-1409.

Choate, K.A., Kahle, K.T., Wilson, F.H., Nelson-Williams, C., and Lifton, R.P.

(2003). WNK1, a kinase mutated in inherited hypertension with hyperkalemia, localizes to diverse Cl⁻-transporting epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 663-668.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* *162*, 156-159.

Cutler, J.A., Sorlie, P.D., Wolz, M., Thom, T., Fields, L.E., and Roccella, E.J. (2008). Trends in hypertension prevalence, awareness, treatment, and control rates in United States adults between 1988-1994 and 1999-2004. *Hypertension* *52*, 818-827.

de Los Heros, P., Kahle, K.T., Rinehart, J., Bobadilla, N.A., Vazquez, N., San Cristobal, P., Mount, D.B., Lifton, R.P., Hebert, S.C., and Gamba, G. (2006). WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 1976-1981.

Delaloy, C., Lu, J., Houot, A.M., Disse-Nicodeme, S., Gasc, J.M., Corvol, P., and Jeunemaitre, X. (2003). Multiple promoters in the WNK1 gene: one controls expression of a kidney-specific kinase-defective isoform. *Mol Cell Biol* *23*, 9208-9221.

Delpire, E., and Gagnon, K.B. (2006). SPAK and OSR1, key kinases involved in the regulation of chloride transport. *Acta Physiol (Oxf)* *187*, 103-113.

Delpire, E., and Gagnon, K.B. (2008). SPAK and OSR1: STE20 kinases involved in the regulation of ion homeostasis and volume control in mammalian cells. *Biochem J* *409*, 321-331.

Ecelbarger, C.A., Kim, G.H., Knepper, M.A., Liu, J., Tate, M., Welling, P.A., and Wade, J.B. (2001). Regulation of potassium channel Kir 1.1 (ROMK) abundance in the thick ascending limb of Henle's loop. *J Am Soc Nephrol* *12*, 10-18.

Ecelbarger, C.A., Kim, G.H., Terris, J., Masilamani, S., Mitchell, C., Reyes, I., Verbalis, J.G., and Knepper, M.A. (2000). Vasopressin-mediated regulation of epithelial sodium channel abundance in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F46-53.

Ellison, D.H., Velazquez, H., and Wright, F.S. (1985). Stimulation of distal potassium secretion by low lumen chloride in the presence of barium. *Am J Physiol* 248, F638-649.

Erlich, P.M., Cui, J., Chazaro, I., Farrer, L.A., Baldwin, C.T., Gavras, H., and DeStefano, A.L. (2003). Genetic variants of WNK4 in whites and African Americans with hypertension. *Hypertension* 41, 1191-1195.

Fang, L., Garuti, R., Kim, B.Y., Wade, J.B., and Welling, P.A. (2009). The ARH adaptor protein regulates endocytosis of the ROMK potassium secretory channel in mouse kidney. *J Clin Invest* 119, 3278-3289.

Fenton, R.A., and Knepper, M.A. (2007). Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium. *Physiol Rev* 87, 1083-1112.

Flatman, P.W. (2007). Cotransporters, WNKs and hypertension: important leads from the study of monogenetic disorders of blood pressure regulation. *Clin Sci (Lond)* 112, 203-216.

Flatman, P.W. (2008). Cotransporters, WNKs and hypertension: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17, 186-192.

Fu, Y., Subramanya, A., Rozansky, D., and Cohen, D.M. (2006). WNK kinases influence TRPV4 channel function and localization. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F1305-1314.

Gagnon, K.B., England, R., and Delpire, E. (2006). Volume sensitivity of cation-Cl⁻ cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: Ste20-related

proline-alanine-rich kinase and WNK4. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C134-142.

Gagnon, K.B., England, R., and Delpire, E. (2007a). A single binding motif is required for SPAK activation of the Na-K-2Cl cotransporter. *Cell Physiol Biochem* 20, 131-142.

Gagnon, K.B., England, R., Diehl, L., and Delpire, E. (2007b). Apoptosis-associated tyrosine kinase scaffolding of protein phosphatase 1 and SPAK reveals a novel pathway for Na-K-2Cl cotransporter regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1809-1815.

Gamba, G. (1999). Molecular biology of distal nephron sodium transport mechanisms. *Kidney Int* 56, 1606-1622.

Gamba, G. (2005). Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 85, 423-493.

Gimenez, I., and Forbush, B. (2003). Short-term stimulation of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2) by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation of the protein. *J Biol Chem* 278, 26946-26951.

Gimenez, I., and Forbush, B. (2005). Regulatory phosphorylation sites in the NH₂ terminus of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2). *Am J Physiol Renal Physiol* 289, F1341-1345.

Glover, M., Zuber, A.M., and O'Shaughnessy, K.M. (2009). Renal and brain isoforms of WNK3 have opposite effects on NCCT expression. *J Am Soc Nephrol* 20, 1314-1322.

Golbang, A.P., Cope, G., Hamad, A., Murthy, M., Liu, C.H., Cuthbert, A.W., and O'Shaughnessy K, M. (2006). Regulation of the expression of the Na/Cl cotransporter by WNK4 and WNK1: evidence that accelerated dynamin-

dependent endocytosis is not involved. *Am J Physiol Renal Physiol* 291, F1369-1376.

Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., *et al.* (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446, 153-158.

Haas, M., and Forbush, B., 3rd (2000). The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu Rev Physiol* 62, 515-534.

Hadchouel, J., Soukaseum, C., Busst, C., Zhou, X.O., Baudrie, V., Zurrer, T., Cambillau, M., Elghozi, J.L., Lifton, R.P., Loffing, J., and Jeunemaitre, X. (2010) Decreased ENaC expression compensates the increased NCC activity following inactivation of the kidney-specific isoform of WNK1 and prevents hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18109-18114.

Haerteis, S., Krueger, B., Korbmacher, C., and Rauh, R. (2009). The delta-subunit of the epithelial sodium channel (ENaC) enhances channel activity and alters proteolytic ENaC activation. *J Biol Chem* 284, 29024-29040.

Hager, H., Kwon, T.H., Vinnikova, A.K., Masilamani, S., Brooks, H.L., Frokiaer, J., Knepper, M.A., and Nielsen, S. (2001). Immunocytochemical and immunoelectron microscopic localization of alpha-, beta-, and gamma-ENaC in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 280, F1093-1106.

Hansson, J.H., Nelson-Williams, C., Suzuki, H., Schild, L., Shimkets, R., Lu, Y., Canessa, C., Iwasaki, T., Rossier, B., and Lifton, R.P. (1995). Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat Genet* 11, 76-82.

He, G., Wang, H.R., Huang, S.K., and Huang, C.L. (2007). Intersectin links WNK kinases to endocytosis of ROMK1. *J Clin Invest* 117, 1078-1087.

Hoenderop, J.G., van Leeuwen, J.P., van der Eerden, B.C., Kersten, F.F., van der Kemp, A.W., Merillat, A.M., Waarsing, J.H., Rossier, B.C., Vallon, V., Hummler, E., and Bindels, R.J. (2003). Renal Ca²⁺ wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5. *J Clin Invest* *112*, 1906-1914.

Holden, S., Cox, J., and Raymond, F.L. (2004). Cloning, genomic organization, alternative splicing and expression analysis of the human gene WNK3 (PRKWNK3). *Gene* *335*, 109-119.

Hong, C., Moorefield, K.S., Jun, P., Aldape, K.D., Kharbanda, S., Phillips, H.S., and Costello, J.F. (2007). Epigenome scans and cancer genome sequencing converge on WNK2, a kinase-independent suppressor of cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 10974-10979.

Hong, N.J., and Garvin, J.L. (2007). Flow increases superoxide production by NADPH oxidase via activation of Na-K-2Cl cotransport and mechanical stress in thick ascending limbs. *Am J Physiol Renal Physiol* *292*, F993-998.

Hoorn, E.J., Nelson, J.H., McCormick, J.A., and Ellison, D.H. (2011) The WNK kinase network regulating sodium, potassium, and blood pressure. *J Am Soc Nephrol* *22*, 605-614.

Huang, C.L., Yang, S.S., and Lin, S.H. (2008). Mechanism of regulation of renal ion transport by WNK kinases. *Curr Opin Nephrol Hypertens* *17*, 519-525.

Inoue, R., Jian, Z., and Kawarabayashi, Y. (2009). Mechanosensitive TRP channels in cardiovascular pathophysiology. *Pharmacol Ther* *123*, 371-385.

Ito, M., Shichijo, S., Tsuda, N., Ochi, M., Harashima, N., Saito, N., and Itoh, K. (2001). Molecular basis of T cell-mediated recognition of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* *61*, 2038-2046.

Jiang, Y., Ferguson, W.B., and Peng, J.B. (2007). WNK4 enhances TRPV5-

mediated calcium transport: potential role in hypercalciuria of familial hyperkalemic hypertension caused by gene mutation of WNK4. *Am J Physiol Renal Physiol* 292, F545-554.

Kahle, K.T., Gimenez, I., Hassan, H., Wilson, F.H., Wong, R.D., Forbush, B., Aronson, P.S., and Lifton, R.P. (2004). WNK4 regulates apical and basolateral Cl⁻ flux in extrarenal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2064-2069.

Kahle, K.T., Rinehart, J., de Los Heros, P., Louvi, A., Meade, P., Vazquez, N., Hebert, S.C., Gamba, G., Gimenez, I., and Lifton, R.P. (2005). WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16783-16788.

Kahle, K.T., Rinehart, J., Giebisch, G., Gamba, G., Hebert, S.C., and Lifton, R.P. (2008). A novel protein kinase signaling pathway essential for blood pressure regulation in humans. *Trends Endocrinol Metab* 19, 91-95.

Kahle, K.T., Rinehart, J., Ring, A., Gimenez, I., Gamba, G., Hebert, S.C., and Lifton, R.P. (2006). WNK protein kinases modulate cellular Cl⁻ flux by altering the phosphorylation state of the Na-K-Cl and K-Cl cotransporters. *Physiology (Bethesda)* 21, 326-335.

Kahle, K.T., Wilson, F.H., Leng, Q., Lalioti, M.D., O'Connell, A.D., Dong, K., Rapson, A.K., MacGregor, G.G., Giebisch, G., Hebert, S.C., and Lifton, R.P. (2003). WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K⁺ secretion. *Nat Genet* 35, 372-376.

Kaplan, M.R., Plotkin, M.D., Lee, W.S., Xu, Z.C., Lytton, J., and Hebert, S.C. (1996). Apical localization of the Na-K-Cl cotransporter, rBSC1, on rat thick ascending limbs. *Kidney Int* 49, 40-47.

Kokubo, Y., Kamide, K., Inamoto, N., Tanaka, C., Banno, M., Takiuchi, S., Kawano, Y., Tomoike, H., and Miyata, T. (2004). Identification of 108 SNPs in TSC, WNK1, and WNK4 and their association with hypertension in a Japanese

general population. *J Hum Genet* 49, 507-515.

Lalioti, M.D., Zhang, J., Volkman, H.M., Kahle, K.T., Hoffmann, K.E., Toka, H.R., Nelson-Williams, C., Ellison, D.H., Flavell, R., Booth, C.J., *et al.* (2006). Wnk4 controls blood pressure and potassium homeostasis via regulation of mass and activity of the distal convoluted tubule. *Nat Genet* 38, 1124-1132.

Lang, F., Bohmer, C., Palmada, M., Seebohm, G., Strutz-Seebohm, N., and Vallon, V. (2006). (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev* 86, 1151-1178.

Leng, Q., Kahle, K.T., Rinehart, J., MacGregor, G.G., Wilson, F.H., Canessa, C.M., Lifton, R.P., and Hebert, S.C. (2006). WNK3, a kinase related to genes mutated in hereditary hypertension with hyperkalaemia, regulates the K⁺ channel ROMK1 (Kir1.1). *J Physiol* 571, 275-286.

Liedtke, W., and Friedman, J.M. (2003). Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13698-13703.

Liu, Z., Wang, H.R., and Huang, C.L. (2009). Regulation of ROMK channel and K⁺ homeostasis by kidney-specific WNK1 kinase. *J Biol Chem* 284, 12198-12206.

Liu, Z., Xie, J., Wu, T., Truong, T., Auchus, R.J., and Huang, C.L. (2011) Downregulation of NCC and NKCC2 cotransporters by kidney-specific WNK1 revealed by gene disruption and transgenic mouse models. *Hum Mol Genet* 20, 855-866.

Mayan, H., Vered, I., Mouallem, M., Tzadok-Witkon, M., Pazner, R., and Farfel, Z. (2002). Pseudohypoaldosteronism type II: marked sensitivity to thiazides, hypercalciuria, normomagnesemia, and low bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3248-3254.

McCormick, J.A., and Ellison, D.H. (2011) The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions. *Physiol Rev* 91, 177-219.

McCormick, J.A., Nelson, J.H., Yang, C.L., Curry, J.N., and Ellison, D.H. (2011) Overexpression of the sodium chloride cotransporter is not sufficient to cause familial hyperkalemic hypertension. *Hypertension* 58, 888-894.

Moore, T.M., Garg, R., Johnson, C., Coptcoat, M.J., Ridley, A.J., and Morris, J.D. (2000). PSK, a novel STE20-like kinase derived from prostatic carcinoma that activates the c-Jun N-terminal kinase mitogen-activated protein kinase pathway and regulates actin cytoskeletal organization. *J Biol Chem* 275, 4311-4322.

Moriguchi, T., Urushiyama, S., Hisamoto, N., Iemura, S., Uchida, S., Natsume, T., Matsumoto, K., and Shibuya, H. (2005). WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. *J Biol Chem* 280, 42685-42693.

Mullins, L.J., Bailey, M.A., and Mullins, J.J. (2006). Hypertension, kidney, and transgenics: a fresh perspective. *Physiol Rev* 86, 709-746.

Mutig, K., Paliege, A., Kahl, T., Jons, T., Muller-Esterl, W., and Bachmann, S. (2007). Vasopressin V2 receptor expression along rat, mouse, and human renal epithelia with focus on TAL. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F1166-1177.

Naray-Fejes-Toth, A., Snyder, P.M., and Fejes-Toth, G. (2004). The kidney-specific WNK1 isoform is induced by aldosterone and stimulates epithelial sodium channel-mediated Na⁺ transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17434-17439.

Newhouse, S., Farrall, M., Wallace, C., Hoti, M., Burke, B., Howard, P., Onipinla, A., Lee, K., Shaw-Hawkins, S., Dobson, R., *et al.* (2009). Polymorphisms in the WNK1 gene are associated with blood pressure variation and urinary potassium excretion. *PLoS One* 4, e5003.

Newhouse, S.J., Wallace, C., Dobson, R., Mein, C., Pembroke, J., Farrall, M., Clayton, D., Brown, M., Samani, N., Dominiczak, A., *et al.* (2005). Haplotypes of the WNK1 gene associate with blood pressure variation in a severely hypertensive population from the British Genetics of Hypertension study. *Hum Mol Genet* 14, 1805-1814.

Nielsen, S., Maunsbach, A.B., Ecelbarger, C.A., and Knepper, M.A. (1998). Ultrastructural localization of Na-K-2Cl cotransporter in thick ascending limb and macula densa of rat kidney. *Am J Physiol* 275, F885-893.

O'Reilly, M., Marshall, E., Speirs, H.J., and Brown, R.W. (2003). WNK1, a gene within a novel blood pressure control pathway, tissue-specifically generates radically different isoforms with and without a kinase domain. *J Am Soc Nephrol* 14, 2447-2456.

O'Shaughnessy, K.M., and Karet, F.E. (2006). Salt handling and hypertension. *Annu Rev Nutr* 26, 343-365.

Ohta, A., Rai, T., Yui, N., Chiga, M., Yang, S.S., Lin, S.H., Sohara, E., Sasaki, S., and Uchida, S. (2009). Targeted disruption of the Wnk4 gene decreases phosphorylation of Na-Cl cotransporter, increases Na excretion and lowers blood pressure. *Hum Mol Genet* 18, 3978-3986.

Orlov, S.N., Adragna, N.C., Adarichev, V.A., and Hamet, P. (1999). Genetic and biochemical determinants of abnormal monovalent ion transport in primary hypertension. *Am J Physiol* 276, C511-536.

Ortiz, P.A. (2006). cAMP increases surface expression of NKCC2 in rat thick ascending limbs: role of VAMP. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F608-616.

Osada, Y., Miyauchi, R., Goda, T., Kasezawa, N., Horiike, H., Iida, M., Sasaki, S., and Yamakawa-Kobayashi, K. (2009). Variations in the WNK1 gene modulates the effect of dietary intake of sodium and potassium on blood pressure determination. *J Hum Genet* 54, 474-478.

Ponce-Coria, J., San-Cristobal, P., Kahle, K.T., Vazquez, N., Pacheco-Alvarez, D., de Los Heros, P., Juarez, P., Munoz, E., Michel, G., Bobadilla, N.A., *et al.* (2008). Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 8458-8463.

Qi, Z., Whitt, I., Mehta, A., Jin, J., Zhao, M., Harris, R.C., Fogo, A.B., and Breyer, M.D. (2004). Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *Am J Physiol Renal Physiol* *286*, F590-596.

Qiao, Y., Liu, X., Harvard, C., Hildebrand, M.J., Rajcan-Separovic, E., Holden, J.J., and Lewis, M.E. (2008). Autism-associated familial microdeletion of Xp11.22. *Clin Genet* *74*, 134-144.

Rafiqi, F.H., Zuber, A.M., Glover, M., Richardson, C., Fleming, S., Jovanovic, S., Jovanovic, A., O'Shaughnessy, K.M., and Alessi, D.R. (2010) Role of the WNK-activated SPAK kinase in regulating blood pressure. *EMBO Mol Med* *2*, 63-75.

Reiche, J., Theilig, F., Rafiqi, F.H., Carlo, A.S., Miltz, D., Mutig, K., Todiras, M., Christensen, E.I., Ellison, D.H., Bader, M., *et al.* (2010) SORLA/SORL1 functionally interacts with SPAK to control renal activation of Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter 2. *Mol Cell Biol* *30*, 3027-3037.

Richardson, C., and Alessi, D.R. (2008). The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signalling pathway. *J Cell Sci* *121*, 3293-3304.

Richardson, C., Rafiqi, F.H., Karlsson, H.K., Moleleki, N., Vandewalle, A., Campbell, D.G., Morrice, N.A., and Alessi, D.R. (2008). Activation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. *J Cell Sci* *121*, 675-684.

Richardson, C., Sakamoto, K., de los Heros, P., Deak, M., Campbell, D.G., Prescott, A.R., and Alessi, D.R. (2011) Regulation of the NKCC2 ion cotransporter by SPAK-OSR1-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci* *124*, 789-800.

Rinehart, J., Kahle, K.T., de Los Heros, P., Vazquez, N., Meade, P., Wilson, F.H., Hebert, S.C., Gimenez, I., Gamba, G., and Lifton, R.P. (2005). WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 16777-16782.

Ring, A.M., Cheng, S.X., Leng, Q., Kahle, K.T., Rinehart, J., Lalioti, M.D., Volkman, H.M., Wilson, F.H., Hebert, S.C., and Lifton, R.P. (2007a). WNK4 regulates activity of the epithelial Na⁺ channel in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 4020-4024.

Ring, A.M., Leng, Q., Rinehart, J., Wilson, F.H., Kahle, K.T., Hebert, S.C., and Lifton, R.P. (2007b). An SGK1 site in WNK4 regulates Na⁺ channel and K⁺ channel activity and has implications for aldosterone signaling and K⁺ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 4025-4029.

Riviere, J.B., Verlaan, D.J., Shekarabi, M., Lafreniere, R.G., Benard, M., Der Kaloustian, V.M., Shbaklo, Z., and Rouleau, G.A. (2004). A mutation in the HSN2 gene causes sensory neuropathy type II in a Lebanese family. *Ann Neurol* *56*, 572-575.

Rozansky, D.J., Cornwall, T., Subramanya, A.R., Rogers, S., Yang, Y.F., David, L.L., Zhu, X., Yang, C.L., and Ellison, D.H. (2009). Aldosterone mediates activation of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter through an SGK1 and WNK4 signaling pathway. *J Clin Invest* *119*, 2601-2612.

Rubera, I., Loffing, J., Palmer, L.G., Frindt, G., Fowler-Jaeger, N., Sauter, D., Carroll, T., McMahon, A., Hummler, E., and Rossier, B.C. (2003). Collecting duct-specific gene inactivation of alphaENaC in the mouse kidney does not impair

sodium and potassium balance. *J Clin Invest* 112, 554-565.

San-Cristobal, P., Pacheco-Alvarez, D., Richardson, C., Ring, A.M., Vazquez, N., Rafiqi, F.H., Chari, D., Kahle, K.T., Leng, Q., Bobadilla, N.A., *et al.* (2009). Angiotensin II signaling increases activity of the renal Na-Cl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4384-4389.

Schultheis, P.J., Lorenz, J.N., Meneton, P., Nieman, M.L., Riddle, T.M., Flagella, M., Duffy, J.J., Doetschman, T., Miller, M.L., and Shull, G.E. (1998). Phenotype resembling Gitelman's syndrome in mice lacking the apical Na⁺-Cl⁻ cotransporter of the distal convoluted tubule. *J Biol Chem* 273, 29150-29155.

Shaharabany, M., Holtzman, E.J., Mayan, H., Hirschberg, K., Seger, R., and Farfel, Z. (2008). Distinct pathways for the involvement of WNK4 in the signaling of hypertonicity and EGF. *FEBS J* 275, 1631-1642.

Shekarabi, M., Girard, N., Riviere, J.B., Dion, P., Houle, M., Toulouse, A., Lafreniere, R.G., Vercauteren, F., Hince, P., Laganier, J., *et al.* (2008). Mutations in the nervous system--specific HSN2 exon of WNK1 cause hereditary sensory neuropathy type II. *J Clin Invest* 118, 2496-2505.

Shimkets, R.A., Warnock, D.G., Bositis, C.M., Nelson-Williams, C., Hansson, J.H., Schambelan, M., Gill, J.R., Jr., Ulick, S., Milora, R.V., Findling, J.W., and *et al.* (1994). Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 79, 407-414.

Simon, D.B., Karet, F.E., Hamdan, J.M., DiPietro, A., Sanjad, S.A., and Lifton, R.P. (1996a). Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet* 13, 183-188.

Simon, D.B., Nelson-Williams, C., Bia, M.J., Ellison, D., Karet, F.E., Molina, A.M., Vaara, I., Iwata, F., Cushner, H.M., Koolen, M., *et al.* (1996b). Gitelman's

variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet* 12, 24-30.

Sonalker, P.A., and Jackson, E.K. (2007). Norepinephrine, via beta-adrenoceptors, regulates bumetanide-sensitive cotransporter type 1 expression in thick ascending limb cells. *Hypertension* 49, 1351-1357.

Stephens, P., Edkins, S., Davies, H., Greenman, C., Cox, C., Hunter, C., Bignell, G., Teague, J., Smith, R., Stevens, C., *et al.* (2005). A screen of the complete protein kinase gene family identifies diverse patterns of somatic mutations in human breast cancer. *Nat Genet* 37, 590-592.

Subramanya, A.R., Liu, J., Ellison, D.H., Wade, J.B., and Welling, P.A. (2009). WNK4 diverts the thiazide-sensitive NaCl cotransporter to the lysosome and stimulates AP-3 interaction. *J Biol Chem* 284, 18471-18480.

Susa, K., Kita, S., Iwamoto, T., Yang, S.S., Lin, S.H., Ohta, A., Sohara, E., Rai, T., Sasaki, S., Alessi, D.R., and Uchida, S. (2012) Effect of heterozygous deletion of WNK1 on the WNK-OSR1/SPAK-NCC/NKCC1/NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels. *Clin Exp Nephrol*.

Takahashi, N., Chernavvsky, D.R., Gomez, R.A., Igarashi, P., Gitelman, H.J., and Smithies, O. (2000). Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5434-5439.

Timmermans, P.B., Wong, P.C., Chiu, A.T., Herblin, W.F., and Smith, R.D. (1993). New perspectives in angiotensin system control. *J Hum Hypertens* 7 *Suppl* 2, S19-31.

Tobin, M.D., Raleigh, S.M., Newhouse, S., Braund, P., Bodycote, C., Ogleby, J., Cross, D., Gracey, J., Hayes, S., Smith, T., *et al.* (2005). Association of WNK1 gene polymorphisms and haplotypes with ambulatory blood pressure in the general population. *Circulation* 112, 3423-3429.

Turner, S.T., Schwartz, G.L., Chapman, A.B., and Boerwinkle, E. (2005). WNK1 kinase polymorphism and blood pressure response to a thiazide diuretic. *Hypertension* *46*, 758-765.

Unger, T., Chung, O., Csikos, T., Culman, J., Gallinat, S., Gohlke, P., Hohle, S., Meffert, S., Stoll, M., Stroth, U., and Zhu, Y.Z. (1996). Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl* *14*, S95-103.

van der Lubbe, N., Lim, C.H., Fenton, R.A., Meima, M.E., Jan Danser, A.H., Zietse, R., and Hoorn, E.J. (2011) Angiotensin II induces phosphorylation of the thiazide-sensitive sodium chloride cotransporter independent of aldosterone. *Kidney Int* *79*, 66-76.

Verissimo, F., and Jordan, P. (2001). WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. *Oncogene* *20*, 5562-5569.

Vitari, A.C., Deak, M., Morrice, N.A., and Alessi, D.R. (2005). The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem J* *391*, 17-24.

Wall, S.M., Knepper, M.A., Hassell, K.A., Fischer, M.P., Shodeinde, A., Shin, W., Pham, T.D., Meyer, J.W., Lorenz, J.N., Beierwaltes, W.H., *et al.* (2006). Hypotension in NKCC1 null mice: role of the kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* *290*, F409-416.

Weinberger, M.H., Luft, F.C., Bloch, R., Henry, D.P., Pratt, J.H., Weyman, A.E., Rankin, L.I., Murray, R.H., Willis, L.R., and Grim, C.E. (1982). The blood pressure-raising effects of high dietary sodium intake: racial differences and the role of potassium. *J Am Coll Nutr* *1*, 139-148.

Wilson, F.H., Disse-Nicodeme, S., Choate, K.A., Ishikawa, K., Nelson-Williams, C., Desitter, I., Gunel, M., Milford, D.V., Lipkin, G.W., Achard, J.M., *et al.* (2001). Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* *293*,

1107-1112.

Woudenberg-Vrenken, T.E., Bindels, R.J., and Hoenderop, J.G. (2009). The role of transient receptor potential channels in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 5, 441-449.

Wulff, P., Vallon, V., Huang, D.Y., Volkl, H., Yu, F., Richter, K., Jansen, M., Schlunz, M., Klingel, K., Loffing, J., *et al.* (2002). Impaired renal Na(+) retention in the sgk1-knockout mouse. *J Clin Invest* 110, 1263-1268.

Xiao, P., Chen, Y., Jiang, H., Liu, Y.Z., Pan, F., Yang, T.L., Tang, Z.H., Larsen, J.A., Lappe, J.M., Recker, R.R., and Deng, H.W. (2008). In vivo genome-wide expression study on human circulating B cells suggests a novel ESR1 and MAPK3 network for postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 23, 644-654.

Xie, J., Wu, T., Xu, K., Huang, I.K., Cleaver, O., and Huang, C.L. (2009). Endothelial-specific expression of WNK1 kinase is essential for angiogenesis and heart development in mice. *Am J Pathol* 175, 1315-1327.

Xu, B., English, J.M., Wilsbacher, J.L., Stippec, S., Goldsmith, E.J., and Cobb, M.H. (2000). WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem* 275, 16795-16801.

Xu, B.E., Stippec, S., Chu, P.Y., Lazrak, A., Li, X.J., Lee, B.H., English, J.M., Ortega, B., Huang, C.L., and Cobb, M.H. (2005). WNK1 activates SGK1 to regulate the epithelial sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10315-10320.

Xu, J.Z., Hall, A.E., Peterson, L.N., Bienkowski, M.J., Eessalu, T.E., and Hebert, S.C. (1997). Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments. *Am J Physiol* 273, F739-748.

Xu, Q., Modrek, B., and Lee, C. (2002). Genome-wide detection of tissue-specific alternative splicing in the human transcriptome. *Nucleic Acids Res* 30, 3754-3766.

Yang, C.L., Angell, J., Mitchell, R., and Ellison, D.H. (2003). WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. *J Clin Invest* 111, 1039-1045.

Yang, C.L., Liu, X., Paliege, A., Zhu, X., Bachmann, S., Dawson, D.C., and Ellison, D.H. (2007a). WNK1 and WNK4 modulate CFTR activity. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 535-540.

Yang, C.L., Zhu, X., and Ellison, D.H. (2007b). The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is regulated by a WNK kinase signaling complex. *J Clin Invest* 117, 3403-3411.

Yang, S.S., Lo, Y.F., Wu, C.C., Lin, S.W., Yeh, C.J., Chu, P., Sytwu, H.K., Uchida, S., Sasaki, S., and Lin, S.H. (2010) SPAK-knockout mice manifest Gitelman syndrome and impaired vasoconstriction. *J Am Soc Nephrol* 21, 1868-1877.

Yang, S.S., Morimoto, T., Rai, T., Chiga, M., Sohara, E., Ohno, M., Uchida, K., Lin, S.H., Moriguchi, T., Shibuya, H., *et al.* (2007c). Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II: generation and analysis of a Wnk4(D561A/+) knockin mouse model. *Cell Metab* 5, 331-344.

Zagorska, A., Pozo-Guisado, E., Boudeau, J., Vitari, A.C., Rafiqi, F.H., Thastrup, J., Deak, M., Campbell, D.G., Morrice, N.A., Prescott, A.R., and Alessi, D.R. (2007). Regulation of activity and localization of the WNK1 protein kinase by hyperosmotic stress. *J Cell Biol* 176, 89-100.

Zambrowicz, B.P., Abuin, A., Ramirez-Solis, R., Richter, L.J., Piggott, J., BeltrandelRio, H., Buxton, E.C., Edwards, J., Finch, R.A., Friddle, C.J., *et al.* (2003). Wnk1 kinase deficiency lowers blood pressure in mice: a gene-trap screen to identify potential targets for therapeutic intervention. *Proc Natl Acad Sci U S A*

100, 14109-14114.

Zhang, W., Na, T., and Peng, J.B. (2008). WNK3 positively regulates epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6 via a kinase-dependent pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 295, F1472-1484.

X. ANHANG

1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb.1 Die wichtigsten Ionenporter der Niere und ihre Lokalisation im Verlauf des Nephrons (Fenton and Knepper, 2007)

Abb. 2 Schema des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Abb. 3 Gemeinsame Strukturmerkmale der WNK-Kinasen (Kahle et al., 2006)

Abb. 4 Schema der wichtigsten bislang bekannten Effekte von WNK-Kinasen auf Ionenporter (Richardson and Alessi, 2008)

Abb. 5 Regulation von NKCC2 durch WNK3 und SPAK in Abhängigkeit von der intrazellulären Chloridkonzentration (Ponce-Coria et al., 2008)

Abb. 6 Regulation von NCC durch WNK-Kinasen (modifiziert nach Hoorn et al., 2011)

Abb. 7 Modelle der Pathogenese von FHHt (McCormick and Ellison, 2011)

Abb. 8 Beispiel für eine Genotypisierungs-PCR

Abb. 9 Retroorbitale Injektion

Abb. 10 Blutentnahme aus der lateralen Schwanzvene

Abb. 11 Kannülierung der Trachea; Katheterisierung von A. carotis und V. jugularis

Abb. 12 Platzierung der Flowprobe an der A. renalis

Abb. 13 Generierung einer WNK3-defizienten Mauslinie

Abb. 14 Blutdruckmessung

Abb. 15 Plasmavolumen und Blutvolumen

Abb. 16 RBF

Abb. 17 GFR gesamt

Abb. 18 Urinosmolalität gesamt

Abb. 19 Urinosmolalität nach Wasserentzug

Abb. 20 Urinvolumen

Abb. 21 Trinkvolumen

Abb. 22 Urinosmolalität unter Nidrigsalzbedingungen

Abb. 23 Urinvolumen unter Nidrigsalzbedingungen

Abb. 24 WNK1-mRNA-Expression

Abb. 25 WNK1-Protein-Expression

Abb. 26 WNK4-mRNA-Expression

Abb. 27 Immunhistochemie von pSPAK/OSR1

Abb. 28 Immunhistochemie von pNKCC

Abb. 29 Urinvolumen nach Furosemid-Injektion

Abb. 30 Immunhistochemie von pNCC

Abb. 31 Urinvolumen nach HCT-Injektion

Abb. 32 Immunhistochemie von ENaC

Abb. 33 Urinvolumen nach Amiloridinjektion

Abb. 34 Effekte von WNK3 auf Ionentransporter, soweit sie bislang aus *in-vitro*-Experimenten bekannt sind (modifiziert nach Richardson et Alessi, 2008)

Abb. 35 WNK3-abhängige Modulationen renaler Ionentransporter wie NKCC2 und NCC sind potentielle Mechanismen der Blutdruckregulation (Rinehart et al., 2005)

Abb. 36 Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entwickelter Kompensationsmechanismus des WNK3-Funktionsverlustes durch die WNK1-SPAK/OSR1-Achse (modifiziert nach Richardson et Alessi, 2008)

Tab. 1 Die wichtigsten Strukturen des Tubulussystems und ihre Funktion (Engelhardt und Breves, 2005; Hees und Sinowatz, 2000; Klinke und Silbernagl, 2001)

Tab. 2 Lokalisation der WNK-Kinasen in der Niere und Koloalisation mit wichtigen Intermediärkinasen und Iontentransportern (modifiziert nach Hoorn et al., 2011)

Tab. 3 Übersicht über Mausmodelle WNK-assoziierter Proteine (modifiziert nach Hoorn et al., 2011)

Tab. 4 Überblick über Krebsarten, an denen Mutationen von WNK-Kinasen beteiligt sein könnten (modifiziert nach McCormick and Ellison, 2011)

Tab. 5 GFR bei männlichen und weiblichen Mäusen

Tab. 6 Urinosmolalität bei männlichen und weiblichen Tieren

Tab. 7 Wichtig Plasmaelektrolyte bei Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen

Tab. 8 Na- und K-Exkretion im Urin bei Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen

Tab. 9 Plasmarenin- und Plasmaaldosteronkonzentration bei Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen

Tab. 10 Wichtige Plasmaelektrolyte bei Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen unter Nidrigsalzbedingungen

Tab. 11 Na- und K-Exkretion im Urin bei Wildtyp- und WNK3-KO-Mäusen unter Nidrigsalzbedingungen

2. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A.	Arteria(e)
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting-Enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon
ANGI	Angiotensin I
ANGII	Angiotensin II
AQP	Aquaporin
AT1	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT2	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
CD	Collecting duct
Cl	Chlorid
CLCKB	chloride channel kb
CNT	Connecting tubule

Cy	Carbocyanin
DCT	Distal convoluted tubule
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENaC	Epithelial sodium (Na) channel
et al.	und andere (et alii)
FHHt	Familial hypercalcemic hypertension
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL-WNK1	Full length-WNK1
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
H	Proton
HCT	Hydrochlorothiazid
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSANII	hereditäre sensorische und autonome Neuropathie

I.E.	internationale Einheit
i.p.	intra peritoneal
i.v.	intravenös
K	Kalium
KS-WNK1	Kidney specific-WNK1
KCC	Kalium-Chlorid-Cotransporter
M	molar
min	Minuten
ml, μ l	Milli-, Mikroliter
mg	Milligramm
mmHg	Druckeinheit, 1mmHg = Druck, den 1 mm Quecksilbersäule anhebt
mol	Stoffmenge, mol = $6,02214129 \times 10^{23}$ Teilchen
mRNA	messenger ribonucleic acid
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NKCC	Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter
NCC	Natrium-Chlorid-Cotransporter
O ₂	Sauerstoff
OSR1	oxidative stress responsive 1

PBS	Phosphate-buffered saline
post Inj.	post Injectionem
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PHAI	Pseudohypoaldosteronismus Typ II
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
RT-PCR	Realtime Polymerasekettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RBF	Renaler Blutfluss
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium (K) channel
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
sec	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SGK1	Serum-und Glucocorticoid-induzierte Protein Kinase 1
SPAK	STE20/SPS1-related Pro/Ala-rich kinase

SYBR Green I	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1 <i>H</i> -chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methylbenzothiazol-3-ium-Kation
TAL	Thick ascending limb
TRP	Transient receptor potential
u	Unit (enzymatische Einheit)
UT	Urea Transporter
V.	Vena(e)
vgl.	vergleiche
WNK	With no K (=lysin)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

3. Erklärungen zum Copyright

Abb. 1: Die Zeitschrift „Physiological Reviews“ gestattet freundlicherweise die direkte Übernahme einzelner Abbildungen zur Veröffentlichung in Dissertationsschriften.

(Originalartikel: <http://physrev.physiology.org/content/87/4/1083.long>)

Abb. 3: Die Zeitschrift „Physiology“ gestattet freundlicherweise die direkte Übernahme einzelner Abbildungen zur Veröffentlichung in Dissertationsschriften.

(Originalartikel: <http://physiologyonline.physiology.org/content/21/5/326.long>)

Abb. 4: Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung des „Journal of Cell Science“ gedruckt.

(Originalartikel: <http://jcs.biologists.org/content/121/20/3293.long>)

Abb. 5: Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung der „National Academy of Sciences, U.S.A.“ gedruckt.

(Originalartikel: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2448858/>)

Abb.7: Die Zeitschrift „Physiological Reviews“ gestattet freundlicherweise die direkte Übernahme einzelner Abbildungen zur Veröffentlichung in Dissertationsschriften.

(Originalartikel: <http://physrev.physiology.org/content/91/1/177.long>)

Abb. 35: Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung der „National Academy of Sciences, U.S.A.“ gedruckt.

(Originalartikel: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1283841/>)

XI. DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Castrop für die Überlassung des Themas, die stets konstruktive Kritik und die sowohl in fachlicher als auch in zwischenmenschlicher Hinsicht hervorragende Betreuung.

Ich danke Herrn Professor Dr. Wanke für die Übernahme der Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und seine freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Ein großer Dank geht an Frau Dr. Oppermann für die überaus geduldige und kompetente Anleitung beim Erlernen der Maus-chirurgischen Methoden und die stets gewährte Hilfestellung.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei den Kolleginnen und Kollegen meiner Arbeitsgruppe an der Universität Regensburg, insbesondere bei Frau Isabel Carota und Frau Veronika Kattler, für die gute Atmosphäre im Labor und die große Hilfsbereitschaft.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich mein ganzes Leben lang unterstützt und motiviert haben.

Meinem Lebensgefährten Christian Ebert danke ich für seine Liebe und seine große Geduld, die er mir seit mittlerweile mehr als neun Jahren entgegenbringt.