

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie
des Zentrums für Experimentelle Medizin

Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

Rolle der WNK Kinasen bei der Regulation des Elektrolyttransportes im distalen Nephron der BK β 1-Knock-out-Maus

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Annelen Dittmer
aus Buchholz i.d.N.

Hamburg 2013

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.05.2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. H. Ehmke

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. rer. nat. E. Schwedhelm

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. med. C. Meyer-Schwesinger

Für Jens Martin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
1.1 Arterielle Hypertonie im Zusammenhang mit der Natriumaufnahme.....	7
1.2 Natrium- und Kaliumtransportsysteme in der Niere.....	9
1.3 Gordons Syndrom: Entdeckung der Rolle von WNK Kinasen bei der Blutdruckregulation.....	17
1.4 Die WNK Kinasen.....	18
1.5 Effekte von WNK Kinasen auf den Elektrolythaushalt.....	20
1.6 Ziel und Vorgehen in der Arbeit.....	25
2. Material und Methoden.....	27
2.1 Material.....	27
2.1.1 Allgemeine Laborgeräte.....	27
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.3 Chemikalien.....	30
2.1.4 Enzyme.....	31
2.1.5 Biochemikalien.....	32
2.1.6 Kit.....	33
2.1.7 Lösungen, Puffer.....	33
2.2 Methoden.....	36
2.2.1 Kaliumdiäten der Tiere.....	36
2.2.2 Schutzmaßnahmen bei der RNA-Isolierung.....	37
2.2.3 Dissektion der Niere und Isolierung der Nierenzonen-RNA.....	37
2.2.4 OD-Vermessung der isolierten Nieren-RNA.....	39
2.2.5 Agilent-Vermessung der isolierten Nieren-RNA.....	39
2.2.6 Mikrodissektion.....	40
2.2.7 RNA-Isolierung der Nephrontubuli.....	41
2.2.8 Reverse Transkriptase (RT).....	42
2.2.9 Actin-PCR.....	43

2.2.10 Agarosegelelektrophorese.....	44
2.2.11 Real-time PCR.....	44
2.2.12 Statistik.....	49
3. Ergebnisse.....	51
3.1 Vergleich von Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen.....	51
3.1.1 Ergebnisse der Real-time PCR-Analyse des Kortexabschnittes	51
3.1.2 Ergebnisse der Real-time PCR-Analyse der Mikrodissektion.....	55
3.2 Ergebnisse der Kaliumdiäten.....	58
3.2.1 Der luminale Natriumtransporter NCC und der epitheliale Natriumkanal ENaC β unter Kaliumdiät	58
3.2.2 Der apikale Kaliumkanal ROMK unter Kaliumdiät	61
3.2.3 Die WNK Kinasen unter Kaliumdiät	62
3.2.4 Die SGK1 Kinase und das Protein GRP58 unter Kaliumdiät	64
3.2.5 Das Protein CHIF unter Kaliumdiät	66
3.2.6 Der Transporter NKCC2 unter Kaliumdiät	67
4. Diskussion.....	68
4.1 Motivation der Fragestellung.....	68
4.2 Wildtyp-Mäuse unter Kaliumdiät.....	69
4.2.1 Der Natrium-Chlorid-Cotransporter (NCC)	72
4.2.2 Der epitheliale Natriumkanal (ENaC)	72
4.2.3 Der luminale Kaliumkanal ROMK	73
4.2.4 Verhalten der Kinasen.....	75
4.2.5 Weitere mögliche Aldosteronziele.....	79
4.3 Der Vergleich von Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen.....	82
4.3.1 Ergebnisse der Real-time PCR unter normaler Diät	82
4.3.2 Ergebnisse der Mikrodissektion.....	84
4.4 BK β 1-Knock-out-Mäuse unter Kaliumdiät.....	85

4.4.1	Kaliumreduzierte Diät bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen....	85
4.4.2	Kaliumreiche Diät bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen	88
4.5	Ausblick.....	90
5.	Zusammenfassung.....	93
6.	Abkürzungsverzeichnis	94
7.	Abbildungsverzeichnis.....	98
8.	Tabellenverzeichnis.....	101
9.	Literaturverzeichnis	102
10.	Danksagung.....	119
11.	Lebenslauf.....	120
12.	Eidesstattliche Versicherung.....	121

1. Einleitung

1.1 Arterielle Hypertonie im Zusammenhang mit der Natriumaufnahme

Die arterielle Hypertonie gehört heute zu den häufigsten Erkrankungen in den Industrienationen und betrifft in Deutschland ca. 25% der erwachsenen Bevölkerung, während weltweit von einer Milliarde betroffenen Patienten ausgegangen wird. In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass das Risiko, eine kardiovaskuläre, cerebrovaskuläre oder renale Erkrankung zu entwickeln, bei dieser Patientengruppe stark erhöht ist (Huang und Kuo 2007). Dabei steigt das kardiovaskuläre Risiko proportional zur Höhe des arteriellen Blutdrucks. Da die Erkrankung zunächst symptomlos bleibt, erfolgen die frühzeitige Diagnosestellung und der rechtzeitige Therapiebeginn bei der arteriellen Hypertonie oft nicht. Als Endorganschäden des Bluthochdrucks können in Folge der verursachten Arteriosklerose ein Myokardinfarkt, ein Aneurysma oder ein Apoplex auftreten (San-Cristobal et al. 2008).

Trotz der herausragenden Bedeutung der arteriellen Hypertonie als Risikofaktor ist ihre Ätiologie noch weitgehend unbekannt. Bei der Klassifizierung wird zwischen der essentiellen Hypertonie und der sekundären Hypertonie unterschieden. Bei über 90% der betroffenen Patienten liegt eine essentielle Hypertonie vor, deren Ursache ungeklärt ist (San-Cristobal et al. 2008).

Die Niere spielt unter verschiedenen physiologischen Bedingungen eine entscheidende Rolle als zentrales Regulationssystem des Elektrolythaushaltes und ist daher in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie von großer Bedeutung. So stellt eine Fehlregulation der Natriumrückresorption in der Niere eine der wichtigsten Ursachen der Hypertonie dar (Coffmann et al. 2008). Die positive Korrelation zwischen arterieller Hypertonie und Natriumaufnahme wurde zuerst von Ambard und Beaujard 1904 propagiert (Ambard und Beaujard 1904). Den kausalen Zusammenhang zwischen Salzaufnahme und Hypertonie konnten Dahl und

Kollegen in den 1950ern nachweisen (Dahl et al. 1962). Guyton und Mitarbeiter zählten zu den Ersten, die der Niere eine entscheidende Schlüsselrolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Hypertonie zuteilten. Sie postulierten als Ursache der Hypertonie eine gestörte Natriumbalance, bedingt durch die verminderte Fähigkeit der Niere, eine der aufgenommenen Salzmenge entsprechende Natriummenge auszuscheiden (Guyton et al. 1972). Die Schwankungen des Perfusionsdruckes in der Niere bestimmen die Wasser- und Natriumausscheidungen und damit die Veränderungen des Blutvolumens. Die Drucknatriurese in der Niere spielt eine Schlüsselrolle in der Langzeitregulation des arteriellen Blutdrucks (Guyton 1991). Auch neuere Studien konnten die dominierende Rolle der Niere in der langfristigen Blutdruckregulation bestätigen.

Eine zentrale Rolle bei der Regulierung des Natrium- und Kaliumhaushaltes spielt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Die Peptidase Renin wird aus den juxtaglomerulären Zellen sekretiert, die sich an der afferenten Arteriole der Nierenglomeruli befinden. Als Stimuli der Sekretion gelten ein verminderter Perfusionsdruck der Niere, z.B. bedingt durch einen Blutdruckabfall, eine β -adrenerge Stimulation der Zellen sowie der Abfall der luminalen NaCl-Konzentration im Macula-densa-Segment des Nierentubulus. Das freigesetzte Renin spaltet das plasmatische α 2-Globulin Angiotensinogen in Angiotensin I, das durch das endotheliale Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) in das aktive Hormon Angiotensin II überführt wird. Angiotensin II führt unter anderem zur Freisetzung des Steroidhormons Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde (Wuttke 2000). Neben Angiotensin II aus dem RAA-System gilt auch eine Hyperkaliämie als Sekretionsreiz für eine Aldosteronfreisetzung (Ring et al. 2007a). Aldosteron stimuliert die Natriumchloridresorption im distalen Nephron und im Kolon sowie in Speichel- und Schweißdrüsen. Ebenfalls kommt es in der Niere zu einer erhöhten Ausscheidung von Kalium und Protonen (Wuttke 2000). Als Ziele der Aldosteronwirkung in der Niere werden der epitheliale Natriumkanal ENaC (Muller et al. 2003), die Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase 1 (SGK1) (Naray-Fejes-Toth et al. 1999), das G-Protein K-Ras 2 (Spindler et al. 1997) sowie das Peptid CHIF (channel inducing factor)

diskutiert (Brennan und Fuller 1999). Weitere Studien zeigten, dass die Na^+ - K^+ -ATPase (Spindler et al. 1997), der Natriumchloridcotransporter NCC (Knepper et al. 2003) und die kurze WNK Kinase 1 (Wade et al. 2006) als Ziel von Aldosteron betrachtet werden können. Dies erreicht das Hormon durch die Interaktion mit einem Mineralkortikoid-Rezeptor (MR), der nur im distalen Nephron nachgewiesen werden kann (Muller et al. 2003). Dieser liegt als zytoplasmatischer, liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor vor, der in Abwesenheit von Aldosteron durch einen Proteinkomplex aus Hitzeschockproteinen inaktiviert wird. Die Aktivierung des MR durch Kortisol, das sich in seinem strukturellen Aufbau vom Aldosteron nur gering unterscheidet, wird durch die 11β -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase (11β -HSD) verhindert. Sie metabolisiert Kortisol zu Kortison, so dass eine Bindung am MR nicht möglich ist (Landau 2006).

1.2 Natrium- und Kaliumtransportsysteme in der Niere

In der Niere wird Natrium vollständig im Glomerulus filtriert und anschließend bis zu 99% sukzessiv in den einzelnen Nephronsegmenten zurückresorbiert. Dabei erfolgt im proximalen Tubulus und im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife bereits bis zu 90% der Natriumreabsorption, während im distalen Nephronabschnitt anschließend die Feinregulierung der Natriumbilanz stattfindet (Kleta et al. 2006, Wang und Giebisch 2009).

Im proximalen Tubulus wird das filtrierte Natrium hauptsächlich über den NHE3-Transporter (Na^+/H^+ exchanger type 3) resorbiert, der elektroneutral Natrium gegen Protonen austauscht (Amemiya et al. 1995). Bei einem Defekt dieses Nephronsegmentes tritt das renale Fanconi-Syndrom auf, das sich neben Aminoazidurie, Glukosurie, Proteinurie und Polyurie durch die klinisch dominante Phosphaturie bei den betroffenen Patienten auszeichnet, die zu Wachstumsstörungen in der frühen Kindheit und später zur Osteomalazie im Erwachsenenalter führt (Kleta et al. 2006). Im proximalen Tubulus finden sich weitere natriumgekoppelte Transporter in der luminalen Membran, die den chemischen und elektrischen Gradienten von Natrium nutzen, um durch sekundären aktiven Transport z.B. Glucose, Aminosäuren und Phosphat aufzunehmen (Kleta et al. 2006). Auf der basolateralen Seite wird das aufgenommene Natrium über die Na^+ - K^+ -ATPase aus der Zelle transportiert.

Im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife ist der luminaire elektroneutrale, Bumetanid-sensitive NKCC2-Transporter (Natrium-Kalium-Chlorid-Co-Transporter 2) für die Natriumresorption verantwortlich. Der Transporter, kodiert durch SLC12A1, funktioniert nur, wenn alle drei Ionen vorhanden sind, so dass Kalium hier als limitierender Faktor wirkt (Gamba et al. 1994, Igarashi et al. 1995). Als Antriebskraft für den Ionentransport dient ein elektrochemischer Gradient, der durch die basolaterale Na⁺-K⁺-ATPase generiert wird, die den Übertritt des resorbierten Natriums über die basolaterale Membran vermittelt (Burg 1976). Des Weiteren wurden K⁺-Cl⁻-Cotransporter (KCC4) (Mount und Gamba 2001) und Cl⁻-Kanäle (CLC-Kb) als basolaterale Ionentransporter nachgewiesen (Kobayashi et al. 2001). Ein Teil des vom NKCC2 resorbierten Kaliums wird auf der luminalen Seite durch den Kaliumkanal ROMK1 sekretiert, so dass ein Lumen-positives Potential aufgebaut wird (Wang 2004). Dieses wiederum ist eine Voraussetzung für den parazellulären Transport von Calcium und Magnesium (Hebert und Andreoli 1984). Durch die Natriumresorption im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife wird durch den NKCC2-Transporter eine hohe Osmolalität im Interstitium aufgebaut, die entscheidend für die Regulierung der Wasserresorption ist (Ares et al. 2011). NKCC2 kann durch Furosemid geblockt werden (Kleta et al. 2006). Während die erhöhte Aktivität des Transporters mit der Entwicklung einer Hypertonie verbunden ist, führt die Abnahme oder der Ausfall der Transporteraktivität zu einem massiven Salzverlust und zu Hypotonie (Ares et al. 2011). Bei der autosomal rezessiv vererbten Mutation von NKCC2 tritt das Bartter Syndrom Typ1 auf (Scheinman et al. 1999), während bei einer Mutation des Kaliumkanals ROMK1 vom Bartter Syndrom Typ 2 gesprochen wird (Birkenhager et al. 2001). Beide Funktionsausfälle der Transporter gehen mit vielseitigen Symptomen einher. So entwickelt sich bei den betroffenen Individuen bereits während der Schwangerschaft ein Polyhydramnion. Nach der Geburt kommt es beim Kind zu einer signifikanten Polyurie und Dehydrierung mit Hypermagnesiurie und Hypercalciurie bis hin zur Nephrocalcinose, begleitet von Hypokaliämie und metabolischer Alkalose (Kleta et al. 2006).

Das sich anatomisch anschließende Aldosteron-sensitive distale Nephron (ASDN), bestehend aus distalem konvoluten Tubulus (DCT), Verbindungstubulus (CNT) und kortikalen Sammelrohr (CCD), bestimmt die Ganzkörperbilanz von Natriumchlorid und Kalium (Reilly et al. 2000) (vgl. Abb.1). Der DCT beginnt unmittelbar nach der Macula densa und ist in zwei Abschnitte geteilt. Entscheidend für den Natriumtransport sind in diesem Bereich die Transporter NCC und ENaC. Der Thiazid-sensitive Natriumchloridcotransporter NCC gehört zu der Familie der SCL 12-Cotransporter und wird in der Säugetiere nur in der apikalen Membran des DCT exprimiert (Obermüller et al. 1995, Bostanjoglo et al. 1998). Er umfasst zwölf membranumspannende Domänen, zwei extrazelluläre Glykosylierungsseiten, eine intrazelluläre NH₂-End-Domäne und eine große COOH-End-Domäne (Gamba et al. 1994, Kunchaparty et al. 1999). Seine Aufgabe besteht in der elektroneutralen Reabsorption des gefilterten Natriums (5-8% des Gesamtnatriums) (Golbang et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Aldosteron und die chronische Behandlung mit Thiazid-Diuretika die NCC Membrandichte erhöhen (Morsing et al. 1991, Velazquez et al. 1996). Eine mögliche Vermittlerrolle bei der Regulierung der NCC-Insertion in die apikale Plasmamembran könnte dabei das Protein GRP58 (Glucose-regulated protein 58) spielen. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurde nachgewiesen, dass die GRP58 Protein-Menge in der Niere in den Epithelzellen des distalen Nephrons am größten ist. In diesem Bereich ist GRP58 in der apikalen Membran neben dem NCC-Transporter angeordnet (Wyse et al. 2002). Die GRP58-Expression ist aber nicht nur auf den NCC-positiven Nephronabschnitt limitiert. GRP58 wurde ursprünglich von Benett und Mitarbeitern geklont und zunächst fälschlicherweise als Phospholipase C- α identifiziert (Benett et al. 1988). Weitere Untersuchungen zeigten, dass es sich dabei um ein Mitglied der Protein-Disulfid-Isomerase-Familie handelt, das durch Glukosespiegelabfall induziert wird und einen Komplex aus zwei homologen Lektinen im endoplasmatischen Retikulum bildet (Van der Wal et al. 1998, Oliver et al. 1999). Wyse und Kollegen konnten zeigen, dass GRP58 mit dem zytoplasmatischen COOH-Ende des NCC-Transporters assoziiert ist und dass die GRP58-Expression die NCC-vermittelte Natriumaufnahme in *Xenopus laevis* Oozyten erhöht (Wyse et al. 2002).

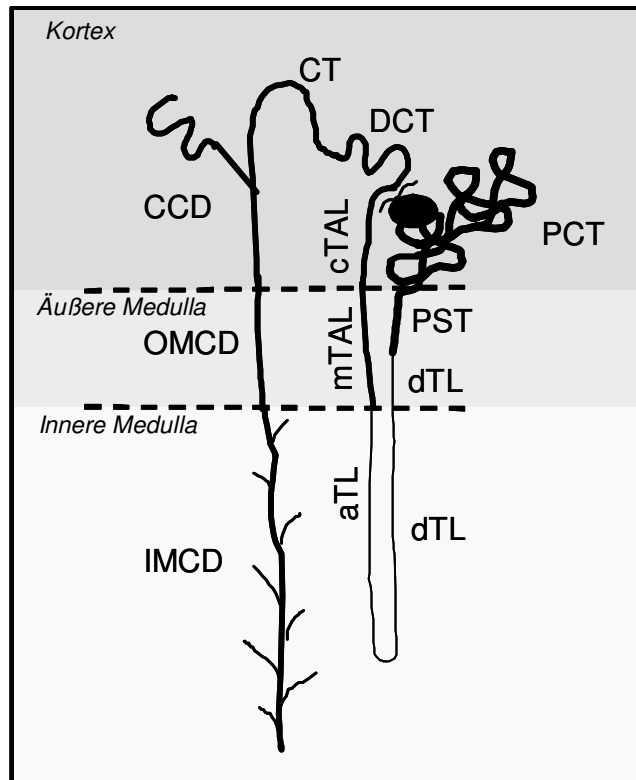


Abb. 1: Schema des strukturellen Aufbaus eines juxtamedullären Nephrons:

An den Globulus schließt sich der proximale Tubulus an, der sich in die Pars convoluta im Kortex (PCT - Proximal Convoluted Tubule) und die Pars recta (PST - Proximal Straight Tubule) in der äußeren Medulla aufteilt und in den Intermediärtubulus mündet. Dieser teilt sich in die Pars descendens (dTL - descending Thin Limb) und in die Pars ascendens (aTL - ascending Thin Limb) auf und wird vom distalen Tubulus gefolgt. Die Pars recta des distalen Tubulus (TAL - Thick Ascending Limb) besteht aus einem medullären Anteil (mTAL) und einem kortikalen Anteil (cTAL). Die Tubuliabschnitte dTL, aTL, mTAL und cTAL werden funktionell zur Henle-Schleife zusammengefasst. Es folgt die Pars convoluta des distalen Tubulus (DCT - Distal Convoluted Tubule), das Verbindungsstück (CT - Connecting Tubule) und das Sammelrohr (CD - Collecting Duct), welches sich in die drei Abschnitte kortikales Sammelrohr (CCD - Cortical Collecting Duct), äußeres medulläres Sammelrohr (OMCD - Outer Medulla Collecting Duct) und inneres medulläres Sammelrohr (IMCD - Inner Medulla Collecting Duct) aufteilt (Abbildung verändert nach H. Vitzthum).

Der Amilorid-sensitive Natriumtransporter ENaC besteht aus drei homologen Untereinheiten, die als Heterotetramer im Gewebe den aktiven Kanalkomplex aus zwei α -Untereinheiten und jeweils einer β - und γ -Untereinheit bilden. ENaC ist einer der wichtigsten Mediatoren der Aldosteronantwort auf die Natriumbilanz (Ring et al. 2007a). Die α -Untereinheit wird durch Veränderung der Syntheserate und der Endo- und Exozytose kontrolliert, wohingegen Aldosteron die Menge der β - und γ -Untereinheit vermutlich nur durch Endo- und Exozytose reguliert (Masilamani et al. 1999). Die Endozytose wird durch das Protein Nedd4-2 (E3 ubiquitin-protein ligase) vermittelt, das mit dem PY-Motiv der β - und γ -Untereinheit des Kanals interagiert (Kamynina und Staub 2002). Durch Phosphorylierung von Nedd4-2 durch die SGK1 Kinase, deren

Expression aldosteronabhängig ist (Naray-Fejes-Toth et al. 1999), wird diese Interaktion verhindert (Pearce et al. 2000, Debonneville et al. 2001, Vallon et al. 2005). Die wichtige Rolle von ENaC bei der Blutdruckregulierung zeigt sich beim Krankheitsbild des Liddle-Syndroms, bei dem es durch eine Gain-of-function-Mutation des Kanals zu schwerer Hypertonie kommt (Shimkets et al. 1994).

Während die Natriumresorption im DCT1 nur über den NCC-Transporter erfolgt, findet sie im zweiten Abschnitt (DCT2) sowohl mit Hilfe des NCC- als auch des ENaC-Transporters statt. Im folgenden Verbindungstubulus CNT und Sammelrohr CD wird ENaC dann als der entscheidende Natriumresorptionsweg betrachtet (San-Cristobal et al. 2008).

Die Niere spielt ebenfalls bei der Regulation der Kaliumbilanz des Körpers eine Schlüsselrolle. Im Glomerulus wird das Kalium frei in den Primärurin gefiltert, entlang des proximalen Tubulus und dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife wieder resorbiert sowie im Verbindungstubulus und Sammelrohr zum Teil erneut sekretiert. Lange ist davon ausgegangen worden, dass die Kaliumsekretion dabei vor allem im Sammelrohr reguliert wird. Neuere Erkenntnisse weisen aber auch daraufhin, dass dem DCT und CNT bei der heutigen Ernährungssituation die entscheidende Bedeutung im Rahmen der Regulation des Kaliumhaushaltes zukommt und dass das Sammelrohr nur bei vermehrter Kaliumsekretion von Bedeutung ist (Meneton et al. 2004).

Im Verbindungstubulus CNT und im kortikalem Sammelrohr CCD sind zwei morphologisch unterschiedliche Zellen, Haupt- und Nebenzellen, an der Kaliumsekretion beteiligt, welche prinzipiell als ein Zwei-Schritt-Prozess stattfindet: Kalium gelangt in die Zelle via der basolateralen $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ und wird durch den apikalen Kaliumkanal entlang eines elektrochemischen Gradienten in das Lumen sekretiert (Schlatter et al. 1987). Zwei Typen von Kaliumkanälen, ROMK- und BK-Kanäle, sind in erster Linie für die Kaliumsekretion entscheidend (Huang et al. 2008b). Der ROMK-Kanal, der beim Ruhemembranpotential und bei der basalen intrazellulären Calciumkonzentration eine höhere Öffnungswahrscheinlichkeit als der BK-Kanal hat (Estilo et al. 2008), wird vor allem für die basale Kaliumsekretion

verantwortlich gemacht (Hebert 1995). Er zeichnet sich durch eine geringere Leitfähigkeit aus (Estilo et al. 2008). Die BK-Kanäle werden erst bei erhöhtem Fluss stimuliert, weswegen ihnen eine Rolle bei der fluss-stimulierten Kaliumsekretion (FIKS, flow-induced potassium secretion) im distalen Tubulus und im CCD zugeschrieben wird (Woda et al. 2001).

Beim ROMK-Kanal, der aus zwei membranumspannenden Segmenten mit zytoplasmatischen C- und N-Enden besteht (Doyle 1998), lassen sich drei Isoformen unterscheiden. ROMK1 codiert ein Polypeptid von 391 AS, während bei ROMK2 die ersten 19 AS fehlen und ROMK3 eine eigene Sequenz für die ersten 19 AS besitzt (Ho et al. 1993, Zhou et al. 1994). Die ROMK-Kanäle wurden in den Nephronabschnitten vom aufsteigenden Teil der Henle-Schleife bis hin zum Sammelrohr nachgewiesen (Storner et al. 1999). Im Verbindungstubulus und im kortikalen Sammelrohr befinden sich die Kanäle nur in der apikalen Membran der Hauptzellen und nicht in den Nebenzellen (Frindt und Palmer 2004) und bestehen aus einem Heteromer aus ROMK1 und ROMK2 (Hebert 1995). Die Aktivierung der ROMK-Kanäle erfolgt durch externes Kalium, Phosphatidylinositol 4,5-Biphosphate, durch die SGK1 Kinase und durch PIP2 (Plutznick und Sansom 2006). Die ROMK-Kanäle sind pH-sensitiv, wobei die Kanalaktivität bei einer Abnahme des Zell-pH-Wertes von 7,4 auf 7,0 pH vollständig gehemmt wird (Choe et al. 1997). Außerdem ruft intrazelluläres Calcium eine Inhibition hervor (Sackin et al. 2003). Eine neuere Untersuchung zeigte, dass die Kaliumsekretion durch ROMK von intra- und extrazellulären Magnesium beeinflusst wird (Yang et al. 2010).

Die Natriumrückresorption ist die Voraussetzung für die Kaliumsekretion über die ROMK-Kanäle. Durch die Aktivität des ENaC-Kanals wird mit der elektrogenen Natriumreabsorption eine lumenegative elektrische Potentialdifferenz aufgebaut, die die Antriebskraft für die Kaliumsekretion im Sammelrohr zur Verfügung stellt. Das aufgenommene Natrium wird aus der Zelle über die basolaterale Membran im Austausch gegen Kalium über die basolaterale $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ abtransportiert. Die hohe Kaliumkonzentration in der Zelle und die lumenegative Spannung stellen somit die Triebkraft für die

Kaliumsekretion zur Verfügung. Die lumenegative Spannung dient auch der Chloridreabsorption entlang des parazellulären Weges (Leng et al. 2006).

BK-Kanäle (big conductance Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanal) werden auch als MaxiK-Kanäle bezeichnet und kommen ubiquitär in Zellen und Geweben vor (Plutznick und Sansom 2006). In der Niere befinden sich die BK-Kanäle in Podozyten, Mesangiumzellen und verschiedenen Tubulussegmenten. Im Verbindungstubulus können die BK-Kanäle sowohl in Haupt- als auch Nebenzellen nachgewiesen werden, im CCD-Abschnitt dagegen nur in den Nebenzellen (Grimm et al. 2007).

Die BK-Kanäle bestehen aus einem Tetramer aus einer porenbildenden α -Untereinheit mit akzessorischen β -Untereinheiten. BK-Kanäle zeichnen sich durch eine hohe Variabilität in Bezug auf ihre pharmakologischen Eigenschaften, ihre Phosphorylierung durch Kinasen, ihre Sensitivität gegenüber Calcium sowie ihre Spannungsabhängigkeit aus. Diese Variabilität der Funktion der BK-Kanäle beruht auf alternativen Splicingformen der α -Untereinheit und ihrer Assoziation mit einer der vier β -Untereinheiten ($\beta 1-4$), die gewebespezifisch unterschiedlich stark exprimiert werden (Grimm et al. 2007). In der Niere der Maus wurden BK $\beta 1$, - $\beta 2$ und - $\beta 4$ -Untereinheiten mit Hilfe der PCR nachgewiesen (Grimm et al. 2007, Najjar et al. 2005). BK $\beta 3$ -Transkripte wurden dagegen nur in humanen Podozyten und im CCD-Segment des Kaninchens beschrieben (Morton et al. 2004, Najjar et al. 2005). Die $\beta 1$ -Untereinheit erhöht die Calciumsensitivität des BK α -Kanals, wohingegen die $\beta 4$ -Untereinheit die Calciumempfindlichkeit vermindert sowie den inhibitorischen Einfluss von Iberotoxin und Charybdotoxin auf den BK α -Kanal reduziert (Wang et al. 2006, Meera et al. 2000). Die $\beta 2$ -Untereinheit reduziert ebenfalls die Sensitivität gegenüber Charybdotoxin, verschiebt jedoch die Spannungsaktivierung des BK-Kanals in Richtung positives Membranpotential und führt zu einer schnelleren Inaktivierung des Kanals (Wallner et al. 1999). Der $\beta 3$ -Untereinheit werden ebenfalls inhibitorische Eigenschaften in Bezug auf die Aktivität des BK α -Kanals zugeschrieben (Najjar et al. 2005).

Die Ergebnisse von Studien mit BK α -Knock-out-Mäusen (Rieg et al. 2007) und mit BK $\beta 1$ -Knock-out-Mäusen (Plutznick et al. 2003) zeigten, dass die Fluss-induzierte Kaliumsekretion des BK α -Kanals durch die $\beta 1$ -Untereinheit

vermittelt wird, die bei Mäusen spezifisch in der apikalen Membran des Verbindungstubulus (CNT), bei Ratten auch im CCD nachgewiesen worden ist (Grimm et al. 2007). Bei der Transduktion der flussinduzierten Scherkräfte (flow-induced shear stress) auf die apikalen BK-Kanäle wird als Zwischenschritt die Aktivierung von TRPV4-Kanälen als mögliche Ursache diskutiert (Earley et al. 2005). Durch den folglich vermehrten apikalen Calciueinstrom soll eine Spannungsdifferenz für den Kaliumausstrom via BK-Kanäle aufgebaut werden (Grimm et al. 2007).

Beim apikalen Kaliumtransport im Verbindungstubulus CNT und kortikalen Sammelrohr CCD wird neben ROMK- und BK-Kanälen auch eine Funktion des KCl-Kanals und der H^+K^+ -ATPase zur Kaliumsekretion diskutiert (Wang und Giebisch 2009).

Einen Einfluss auf die Regulierung des Kaliumhaushaltes soll auch das epithelspezifische Transmembranprotein CHIF (channel-inducing factor) haben (Wald et al. 1997), das in *Xenopus laevis* Oozyten eine kaliumspezifische Kanalaktivität induziert (Attali et al. 1995) und als ein potentiell Aldosteronziel diskutiert wird (Brennan und Fuller 1999). Es wurde erstmals 1995 von Attali und Mitarbeiter beim Screening von Rattenkolon-DNA auf aldosteroninduzierten Genen entdeckt. CHIF ist in den distalen Anteilen des Nephrons (medulläre und papilläre Sammelrohre und in den Endabschnitten des Verbindungstubulus) sowie in den Epithelzellen des distalen Kolon selektiv präsent. Eine CHIF mRNA-Expression konnte hingegen im renalen proximalen Tubulus, in der Henle-Schleife und im distalen Tubulus sowie im proximalen Kolon, Dünndarm, Lunge, Choroidplexus, Herz, Skelettmuskel, Speicheldrüsen sowie Gehirn nicht nachgewiesen werden (Capurro et al. 1996). Neuere Studien zeigten, dass CHIF zur Familie der FXYD-Proteine gehört (Pihakaski-Maunsbach et al. 2006). FXYD-Proteine bilden eine Genfamilie der kleinen Membran-Proteine, die sich auf der Basis einer nicht veränderten Aminosäuresequenz mit dem FXYD-Motiv, zwei konservierten Glycin-Resten und einem Serin-Rest definiert. Mindestens fünf der sieben Familienmitglieder FXYD in Säugetieren, FXYD1 (Phospholemma), FXYD2 (γ -Untereinheit der Na^+K^+ -ATPase),

FXYP3 (Mat-8), FXYP4 (CHIF) und FXYP7, interagieren mit der Na⁺-K⁺-ATPase und regulieren diese gewebe- und isoformspezifisch (Geering 2006). Da die FXYP-Mitglieder die Na⁺-K⁺-ATPase Aktivität auf unterschiedliche Art und Weise ändern und ein nicht überlappendes Expressionsmuster in der Niere aufweisen, sind sie möglicherweise die strukturelle Basis für die Nephronsegment-spezifischen Eigenschaften der Na⁺-K⁺-ATPase (Arystarkhova et al. 2005). CHIF befindet sich wie FXYP2 nur in der basolateralen Membran der Zellen und ist spezifisch mit der α -Untereinheit der Na⁺-K⁺-ATPase assoziiert, deren Transporteigenschaften es modifizieren soll (Pihakaski-Maunsbach et al. 2006).

1.3 Gordons Syndrom: Entdeckung der Rolle von WNK Kinasen bei der Blutdruckregulierung

Die arterielle Hypertonie wird zu den polygenetischen Erkrankungen gezählt. Dabei wird postuliert, dass normale Variationen des Genoms durch SNPs (single-nucleotide polymorphismus) Individuen für eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Umweltfaktoren prädisponieren, die die Erkrankung hervorrufen (San-Cristobal et al. 2008). Im vorletzten Jahrzehnt gelang es, 15 Gene zu identifizieren, die diese Erkrankung unter der Annahme, dass bereits eine veränderte Funktion eines einzelnen Gens für die abnorme Veränderung des Blutdruckes ausreicht, bedingen (Lifton et al. 2001). So konnten zum Beispiel durch die Untersuchung seltener erblicher Formen von arterieller Hypertonie und ihrer ursächlichen Mutationen neue Erkenntnisse über die involvierten Faktoren gewonnen werden.

Ein Beispiel für die neu identifizierten Gene ist die Serin/Threonin-Kinase-Familie der WNK. Der Zusammenhang zwischen WNK Kinasen und der Regulierung der Nieren-Ionentransportern und damit der Einfluss der WNK Kinasen auf den Blutdruck ist durch Positionsklonierungsstudien bei Patienten mit Gordons Syndrom entdeckt worden (San-Cristobal et al. 2008). Gordons Syndrom (auch Pseudohyperaldosteronismus Typ II, familiäre hyperkalemische Hypertonie FHHT) ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die mit arterieller Hypertonie einhergeht. Neben metabolischer Azidose und Hypercalciurie zeigen diese Patienten eine Hyperkaliämie und

eine Hypernatriämie. Der Phänotyp kann durch die Gabe von niedrig dosierten Thiazid-Diuretika korrigiert werden (Disse-Nicodeme et al. 2000, Kleta et al. 2006). Die Erkrankung ist ein Spiegelbild des autosomal rezessiv vererbten Gitelmans Syndroms, das durch eine arterielle Hypotonie, assoziiert mit hypokaliämische metabolische Alkalose und Hypocalcämie, gekennzeichnet ist (Gamba 2005). Diese Erkrankung beruht auf einer Mutation im SLC12A3-Gen, das sich im Chromosom 16 befindet und den Thiazid-sensitiven Natriumchlorid-Cotransporter NCC im distalen konvolutem Tubulus kodiert. Durch die Loss-of-function-Mutation kommt es zu einer Inaktivierung des Cotransporters. Hieraus resultiert eine Abnahme der Salzresorption, die zu einer Dehydrierung und Hypotonie führt. Die folglich kompensatorisch vermehrte Natriumresorption des Verbindungstubulus CNT und des Sammelrohrs CD über den ENaC-Transporter induziert dort eine erhöhte Kalium- und Protonensekretion, die sich wiederum in einer hypokaliämischen metabolischen Alkalose widerspiegelt (San-Cristobal et al. 2008, Kleta et al. 2006).

Im Vergleich zu Gitelmans Syndrom ist bei Gordons Syndrom zunächst ebenfalls eine Mutation des NCC, die zu einer verstärkten Aktivierung des Transporters führt, als Ursache vermutet worden. Genomische Analysen widersprechen dieser These aber, da die Erkrankung eine Heterogenität aufweist. Bei zwei Formen von PHAII konnte gezeigt werden, dass sie durch Mutationen in WNK Kinasen bedingt sind. Zum einen ist das Chromosom 12p13 durch Deletion im ersten Intron betroffen, so dass es zu einer fünffach erhöhten Transkription der L-WNK1 kommt (Wilson et al 2001, Delaloy et al. 2003). Zum anderen ist das Chromosom 17 betroffen, bei dem vier voneinander unabhängige Missense-Mutationen der WNK4 nachgewiesen werden konnten (Mansfield et al. 1997, Wilson et al. 2001, Goldbang et al. 2005).

1.4 Die WNK Kinasen

Die WNK (with-no-lysine-kinase) gehören zu der Familie der Serin-Threonin-Kinasen und sind durch ihre im Vergleich zu allen anderen Proteinkinasen atypische Lage eines essentiell katalytischen Lysinrests gekennzeichnet. Die

WNK Kinase besteht aus drei Domänen. Auf die N-terminale 146-200 AS-Domäne folgt die Serin/Threonin-Kinase-Domäne und die große 786-1888 AS-Domäne mit dem Carboxyl-Ende, welche eine autoinhibitorische Domäne sowie zwei gedrehte Spiral-Domänen enthält, die für die Interaktion mit Bindungspartnern wichtig sind (Xu et al. 2000, Verissimo und Jordan 2001). Nur vier WNK Kinasen existieren im menschlichen Genom (Wilson et al. 2001). Die korrespondierenden Gene PRKWINK1, PRKWINK2, PRKWINK3 und PRKWINK4 wurden in den menschlichen Chromosomen 12, 9, 10 und 17 lokalisiert. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz beträgt zwischen den WNK Kinasen in der Amino- und Carboxyl-Domäne weniger als 20% und in der Serin/Threonin-Kinase mehr als 80% (San-Cristobal et al. 2008).

Die WNK Kinase 1 ist als erstes identifiziert worden und ist über 2100 AS lang (Xu et al. 2000). Sie ist die am häufigsten exprimierte Kinase und kommt bei Ratten, Mäusen und Menschen überwiegend in der Niere, im Herzen, in den Muskeln und in den Testes vor. In den meisten Geweben wird WNK1 überwiegend in den polarisierten Epithelzellen exprimiert. Die Kinasen WNK2, 3 und 4 sind Produkte von verschiedenen Genen und ca. 1200 bis 1600 AS lang (Verissimo und Jordan. 2001, Xu et al. 2000). Die WNK3 wurde in allen Abschnitten des Nephrons sowie in den Epithelzellen von verschiedenen Organen wie Pankreas, Magen und Darm sowie im Gegensatz zu den WNK1 und WNK4 auch im zentralen Nervensystem nachgewiesen (Kahle et al. 2005a). Die WNK4 wird hauptsächlich im Aldosteron-sensitiven distalen Nephron exprimiert (Wilson et al. 2001). Sie konnte im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife, im distalen konvolutem Tubulus, im Verbindungstubulus und im Sammelrohr nachgewiesen werden (O'Reilly et al. 2006). Kahle et al. zeigten, dass die WNK4 im DCT vor allem im Bereich der Tight Junctions und in weiter flussabwärts gelegenen Nephronabschnitten vermehrt im Zytoplasma exprimiert wird (Kahle et al. 2005b).

Bei den Kinaseformen WNK1 und WNK3 wurden mehrere alternative Splicing-Formen beschrieben: Bei der WNK1 lässt sich zum einen ein langes Transkript von 2100 AS nachweisen (L-WNK1), das in allen Geweben sowie entlang des gesamten Nephrons vorkommt. Zum anderen wird ein kurzes

Transkript von 1700 AS Länge (KS-WNK1) nur nierenspezifisch im Aldosteron-sensitiven distalen Nephron exprimiert (Lazrak et al. 2006). Die kurze WNK1 (KS-WNK1) beruht auf einer alternativen Splicingform der Exons 1-4, während die verbleibenden Exons 5-28 identisch mit denen der L-WNK1 sind. So fehlen bei der Proteinform der KS-WNK1 die ersten 437 Aminosäuren am N-terminalen Ende. Damit besitzt diese kurze KS-WNK1 keine Kinaseaktivität, jedoch weiterhin eine autoinhibitorische Domäne. In der Niere dominiert die kurze WNK1-Form (Delaloy et al. 2003, O'Reilly et al. 2003). Es sind noch fünf weitere unterschiedliche Transkripte der WNK1 bekannt, die auf Alternativ-Splicing-Formen beruhen (Exon 9, 11, 12). Die funktionelle Konsequenz dieser Isoformen ist jedoch noch unbekannt (San-Cristobal et al. 2008).

1.5 Effekte von WNK Kinasen auf den Elektrolythaushalt

Die WNK Kinasen regulieren den apikalen, basolateralen und parazellulären Ionentransport bei verschiedenen Epithelien. Mehrere Hinweise lassen vermuten, dass die WNK Kinasen auch eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des renalen Ionentransportes spielen (Subramanya et al. 2006a).

Nach dem bisherigen Modell der Elektrolytregulation stellt die Abnahme von extrazellulären Volumen über das Renin-Angiotensin-System einen Sekretionsreiz für Aldosteron dar. Infolgedessen kommt es im Sammelrohr zu einer vermehrten Expression des Natriumtransporters ENaC. Als Konsequenz erhöht sich die Natriumresorption, was zu einem Wiederanstieg des Blutdrucks führt. Mit der erhöhten Natriumresorption durch den ENaC-Transporter ist aber aufgrund der erhöhten elektrochemischen Antriebskraft auch eine vermehrte Kaliumsekretion über den ROMK-Kanal verbunden. Eine vom Kaliumtransport unabhängige Regulation des Natriumchloridtransportes wird aber benötigt, um die Elektrolythomöostase in unterschiedlichen physiologischen Situationen aufrecht zu erhalten (Leng et al. 2006). So führen z.B. sowohl Hypovolemie als auch Hyperkaliämie zur Freisetzung von Aldosteron. Jedoch wird im ersten Fall eine Natriumresorption angestrebt, wohingegen bei Hyperkaliämie eine vermehrte Kaliumsekretion ohne erhöhte

Natriumresorption stattfinden soll. Außerdem zeigen PHA-TypII-Patienten gleichzeitig eine Hyperkaliämie sowie eine Hybernatriämie mit entsprechender Verschlechterung der normalen renalen Ausscheidung dieser Ionen (San-Cristobal et al. 2008). Dies deutet darauf hin, dass für die Steuerung des Natrium- und Kaliumhaushaltes neben dem bekannten Aldosteron-SGK1-Pathway ein weiteres, ergänzendes Steuersystem in Form der WNK Kinasen existieren muss (sogenannter „WNK-Pathway“) (O’Reilly et al. 2006).

Im diskutierten erweiterten Modell der Elektrolytregulation soll der WNK-Pathway dafür sorgen, dass es unabhängig von der Natriumresorption, z.B. bei einem erhöhten Aldosteronspiegel aufgrund einer Hypovolemie, zu einer geregelten Kaliumhomöostase kommen kann (vgl. Abb. 2). Dies soll durch die WNK-vermittelte selektive Aktivierung der Natriumtransporter NCC und ENaC erreicht werden, ohne auch die Aktivität des Kaliumkanals ROMK zu erhöhen. Auf der anderen Seite ist eine Hyperkaliämie ein Stimulus für die Aldosteronsekretion. In dieser Situation wird der Aldosteronanstieg von einer vermehrten Kaliumsekretion begleitet, ohne die Natriumreabsorption zu beeinflussen.

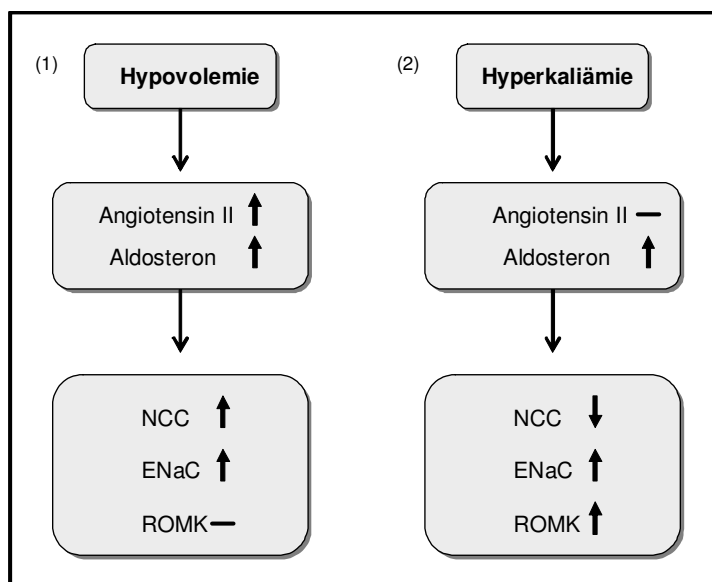


Abb. 2: Diskutiertes Modell der Elektrolytregulation bei Hypovolemie und Hyperkaliämie: „WNK-Pathway“

(1) Bei Hypovolemie kommt es zu einem Aldosteronanstieg über das Renin-Angiotensin-System mit WNK-vermittelter selektiver Aktivierung von NCC und ENaC sowie gesteigerter Natriumresorption ohne Erhöhung der ROMK-Aktivität.

(2) Bei Hyperkaliämie kommt es zu einem selektiven Aldosteronanstieg ohne Veränderung der Angiotensin-II-Menge mit WNK-vermittelter selektiver Aktivierung von ENaC und Inhibition von NCC. Folglich erhöht sich bei gesteigerter ROMK-Aktivität die Kaliumsekretion.

Es wird diskutiert, dass Aldosteron bei Hyperkaliämie über die KS-WNK1 einen Shift von der elektroneutralen Natriumresorption über den NCC hin zur elektrogenen Natriumaufnahme über den ENaC im CNT/CCD induziert und somit die Antriebskraft für die Kaliumsekretion über den ROMK-Kanal erhöht. Damit könnte die Kaliumhomöostase unabhängig von der Natriumaufnahme reguliert werden (O'Reilly et al. 2006).

Die Interaktion zwischen dem Aldosteron-SGK1-Pathway und dem WNK-Pathway ist noch unklar. Gezeigt wurde bislang, dass Aldosteron die Aktivität von ENaC über die Steigerung der Expression von KS-WNK1 erhöhen kann (Naray-Fetes-Toth et al. 2004). Zudem wurde eine Interaktion der SGK1 mit L-WNK1 bzw. WNK4 beschrieben (Xu et al. 2005a).

Durch zahlreiche Studien wurde die modulierende Rolle der WNK Kinasen beim Elektrolythaushalt nachgewiesen (vgl. Abb. 3).

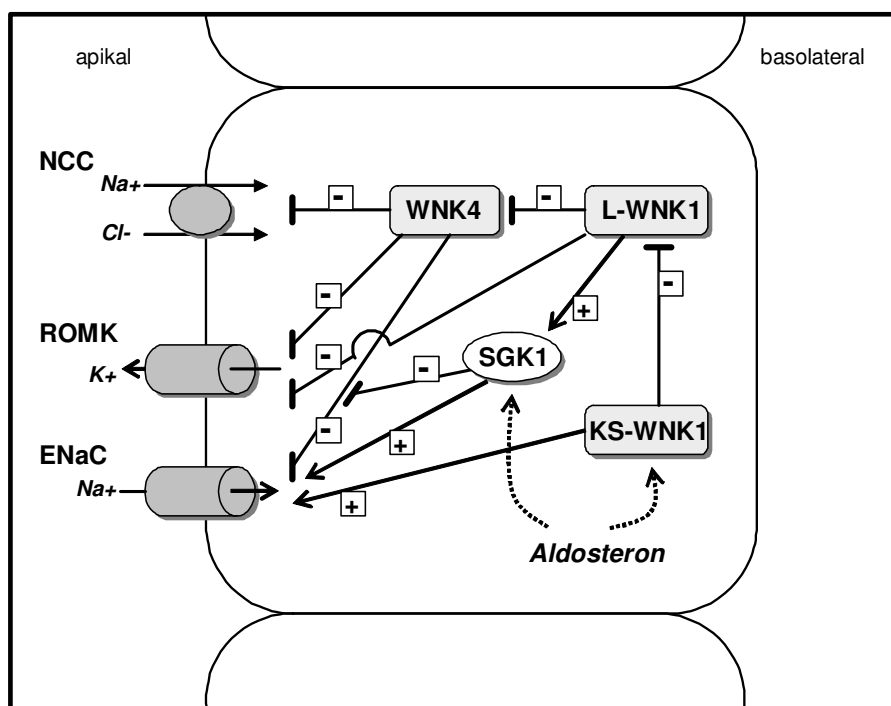


Abb. 3: Diskutierte Effekte der WNK Kinasen im distalen Nephron auf den Natrium- und Kaliumtransport:

Das Modell zeigt eine Zelle des DCT bzw. CCD/CT (in Anlehnung an Subramanya et al. 2009). Die WNK Kinasen wirken stimulierend [+] oder hemmend [-] auf die Ionentransporter. Aldosteron stimuliert unter bestimmten physiologischen Bedingungen KS-WNK1 und SGK1. KS-WNK1 stimuliert den ENaC-Kanal und hemmt L-WNK1, so dass die Hemmung von L-WNK1 auf WNK4 aufgehoben wird und WNK4 den ROMK-Kanal, den NCC-Transporter und den ENaC-Kanal hemmen kann. L-WNK1 soll hingegen indirekt über SGK1 und KS-WNK1 direkt die ENaC-Kanal-Aktivität steigern. SGK1 soll inhibierend auf die WNK4-vermittelte ENaC-Hemmung wirken.

Der Effekt der WNK4 auf den NCC-Kanal ist in *Xenopus laevis* Oozyten-Studien untersucht worden (Wilson et al. 2003, Yang et al. 2003). So hemmt die WNK4 die Aktivität des NCC-Kanal durch Reduzierung der Expression von NCC an der Zelloberfläche. Dies geschieht über eine erhöhte lysomale Degradation des NCC-Proteins (Golbang et al. 2006). Es ist wurde gezeigt, dass dieser Effekt von der WNK4-Kinaseaktivität abhängt (Wilson et al. 2003). Die bekannten PHA-TypII-Mutationen der WNK4 führen zum Verlust der NCC-Hemmung (Yang et al. 2003).

Da das Gordons Syndrom mit Hyperkaliämie assoziiert ist, wurde auch die Interaktion der WNK4 mit ROMK untersucht, da der ROMK-Kanal den wichtigsten Kaliumsekretionsmechanismus in der apikalen Membran des distalen Nephrons darstellt (San-Cristobal et al. 2008). Die WNK4 hemmt den ROMK-Kanal, wobei die katalytische Aktivität der WNK Kinase hierfür nicht nötig ist (Kahle et al. 2003). Die WNK4 führt zu einer gesteigerten Endozytose von ROMK via Clathrin-coated Vesikel. Der Nachweis wurde zunächst in *Xenopus laevis* Oozyten, später auch in Mammaliazellen geführt (Kahle et al. 2003; Peng und Bell 2006). Die PHA-TypII-WNK4-Mutation führt zu einer verstärkten Hemmung vom ROMK-Kanal, so dass damit die Hyperkaliämie bei PHA-TypII Patienten erklärt werden könnte (San-Cristobal et al. 2008). Die Behandlung von HEK-293 Zellen mit siRNA gegen L-WNK1 und WNK4 resultiert in einer erhöhten Aktivität von ROMK. Dies zeigt, dass die basale Aktivität von ROMK von beiden Kinasen moduliert wird (Lazrak et al. 2006).

Die WNK4 reduziert unabhängig von der katalytischen Aktivität der Kinase die Aktivität des Natriumtransporters ENaC über Clathrin-vermittelte Endozytose. Bei einer PHA-TypII-WNK4-Mutation wird hingegen der inhibitorische Effekt von WNK4 auf den ENaC aufgehoben (Ring et al. 2007a). Des Weiteren erhöht die WNK4 den parazellulären Chlorid-Fluss, hemmt jedoch denjenigen von Natrium. Hierfür ist die katalytische Aktivität von WNK4 nötig und ist mit der Phosphorylierung von Claudin 1-4 im Carboxyl-Terminus verbunden. Dies wurde durch zwei Gruppen unabhängig voneinander an MDCKII-Zellen nachgewiesen (Yang et al. 2003, Kahle et al. 2004). Bei PHAII-WNK4-Mutation kommt es zu einer Steigerung der Chloridpermeabilität.

Des Weiteren hemmt die WNK4 die Aktivität der Kalium-Chlorid-Cotransporter KCC1, KCC3 und KCC4, die im distalen Nephron bei der Kaliumsekretion eine Rolle spielen und im Sammelrohr für die Säuresekretion verantwortlich sind. Der inhibitorische Effekt ist kinaseabhängig, wird allerdings nicht durch PHA-TypII-Mutationen hervorgerufen (Garzon-Muvdi et al. 2007).

Die Kinase L-WNK1 hat keinen direkten Effekt auf den Natriumtransporter NCC, sondern greift indirekt über die Blockierung des inhibitorischen Effekts von WNK4 auf NCC ein (Yang et al. 2005). Subramaya und Mitarbeiter zeigten, dass die L-WNK1 die WNK4-Hemmung auf den NCC verhindert, während die alternative Splicingform KS-WNK1 durch ihre dominant negative Interaktion mit L-WNK1 dessen Hemmung auf WNK4 verhindert. Mit dieser doppelten Inhibition vermindert die KS-WNK1 indirekt die Aktivität des Natriumtransporters NCC (Subramanya et al. 2006b).

Lazrak et al. (2006) wiesen im Versuch mit transfektierten HEK-Zellen nach, dass die katalytisch aktive Kinase L-WNK1 die Aktivität des ROMK-Kanals vermindert. Diese Inhibition kann durch die Interaktion von KS-WNK1 mit L-WNK1 aufgehoben werden. Die Aktivitätsabnahme der ROMK-Kanäle basiert dabei auf einer Steigerung der Endozytose der ROMK-Kanäle aus der apikalen Membran und deren Degradation (Chu et al. 2003). Weiterhin konnten Lazrak und Kollegen zeigen, dass die kaliumarme Diät von Ratten mit einem Expressionsanstieg von L-WNK1 und einer Expressionsabnahme von KS-WNK1 assoziiert ist (Lazrak et al. 2006). Es wird vermutet, dass das Verhältnis KS-WNK1/L-WNK1-Expression im DCT und im CNT unter bestimmten physiologischen Bedingungen wie z.B. Hyperkaliämie zugunsten der KS-WNK1 verschoben ist. Dies würde zu einer Verminderung der über L-WNK1 vermittelten Hemmung des ROMK-Kanals sowie zu einer vermehrten Inhibition des NCC über KS-WNK1, L-WNK1 und WNK4 führen. Im Falle einer Hyperkaliämie würde so eine verminderte elektroneutrale Natriumresorption über NCC und eine vermehrte elektrogene Natriumresorption über ENaC mit gesteigerter Kaliumresorption resultieren (Wade et al. 2006). Bei PHA-TypII-Patienten mit einer Mutation im PRKWINK1-Gen ist das Verhältnis zugunsten der L-WNK1 verschoben. Folglich wird die WNK4 gehemmt und die NCC-Aktivität steigt an, so dass es

zu einer vermehrten Natriumresorption mit folgender arterieller Hypertonie kommt (Wade et al. 2006).

Die Kinase L-WNK1 aktiviert den Natriumtransporter ENaC über die Interaktion mit der Serum-Glucocorticoid-Kinase SGK1. SGK1 ist als Schlüssel-Kinase bekannt, durch die Aldosteron seine Effekte auf die Transporter des distalen Nephrons erreicht (Pearce et al. 2000). Die L-WNK1 induziert die Phosphorylierung der SGK1, so dass die Nedd4-2 vermittelte Endozytose von ENaC aufgehoben wird (Xu et al. 2005b).

Der WNK1 wird auch eine Erhöhung des parazellulären Chlorid-Flusses mittels gesteigerter Phosphorylierung von Claudin 4 zugeschrieben (San-Cristobal et al. 2008).

Biochemische Analysen zeigten, dass die WNK1 und die WNK4 auch mit den basolateralen kationengekoppelten Cotransportern (Familie der SLC12) NKCC1 bzw. mit der apikalen Form NKCC2 interagieren. Dabei können die Kinasen eine Phosphorylierung von NKCC nur induzieren, wenn die Serin/Threonin-Kinasen SPAK oder OSR1 (Familie der STE 20) präsent sind (Vitari et al. 2006, Moriguchi et al. 2005). Ebenso wurde gezeigt, dass WNK4 in einer phosphorylierten Form den Natriumtransporter NCC aktivieren kann, wenn die Kinase SPAK vorhanden ist (Welling et al. 2010).

1.6 Ziel und Vorgehen in der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Frage, ob eine Veränderung der Kaliumaufnahme eine Veränderung der Genexpression der an der renalen Natriumresorption beteiligten Transporter bewirkt. Darüber hinaus sollte untersucht werden, welche Kinasen dabei beteiligt sein könnten. Hierfür wurden Wildtyp C57bl6- und BK β 1-Knock-out-Mäusen für die Untersuchungen verwendet.

Die genetisch veränderten Mäuse besitzen keine BK β 1-Untereinheiten des Ca⁺-aktivierten Kaliumkanals und weisen deshalb bei chronisch erhöhtem Plasmaaldosteronspiegel einen um 10-15 mmHg erhöhten Blutdruck auf (Plüger et al. 2000). Mit diesem Tiermodell sollte die in der Literatur diskutierte Beeinflussung des WNK-Pathway durch Aldosteron untersucht

werden. Zusätzlich wurde mittels einer veränderten Kaliumzusammensetzung der Nahrung versucht, den WNK-Pathway zu beeinflussen.

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob eine Veränderung der Kaliumaufnahme über die Nahrung bei Wildtyp-Tieren eine Veränderung der Genexpression der im distalen Nephron exprimierten Transportern und Kinasen hervorruft. Im Anschluss wurde untersucht, ob der bei den BK β 1-Knock-out-Tieren erhöhte Plasmaaldosteronspiegel eine verstärkte Expression der Transporter und Kinasen hervorruft und ob diese darüber hinaus durch eine veränderte Kaliumaufnahme beeinflusst werden kann.

Im ersten Teil wurde die Quantität der mRNA der Nierentransporter und ihrer Regulatoren im Kortex von BK β 1-Knock-out-Mäuse analysiert. Zum Vergleich wurden Wildtyp-Mäuse herangezogen. Hierfür wurden die Ionentransporter ENaC, ROMK und NCC sowie die regulierende Proteine WNK Kinasen 1 (KS-WNK1, L-WNK1), WNK4 und SGK1 nach Gabe einer Standarddiät (0,93% Kalium, 0,24% Natrium) mit Hilfe der Real-time PCR quantifiziert.

Für den zweiten Abschnitt der Arbeit wurden die zwei funktionell unterschiedlichen Abschnitte des distalen Nephrons, distaler konvoluter Tubulus und Verbindungstubulus/Sammelrohr, in Hinblick auf die Aldosteronwirkung untersucht. Hier stand die Frage im Mittelpunkt, ob der in der Literatur diskutierte Shift der Natriumresorption vom NCC-Transporter im distalen Tubulus zum ENaC-Transporter im Sammelrohr auch bei den BK β 1-Knock-out-Tieren mit chronisch erhöhtem Aldosteronspiegel und Hypokaliämie auf Genexpressionsebene zu beobachten ist. Hierfür wurden die beiden mit Hilfe der Mikrodissektion gewonnenen Nephronabschnitte der Knock-out- bzw. Wildtyp-Tiere in Bezug auf das quantitative Vorkommen der KS-WNK1, NCC und ENaC mRNA analysiert.

Der dritte Abschnitt dieser Arbeit behandelt den Einfluss einer veränderten Kaliumaufnahme auf die Genexpression der renalen Transporter im Kortex. Dafür erhielten BK β 1-Knock-out-Tiere und Wildtyp-Tiere eine 14-tägige kaliumarme Diät (0,05% Kalium, 0,24% Natrium) oder eine kaliumreiche Diät (5,0% Kalium, 0,24% Natrium). Mit Hilfe der Real-time PCR wurde die Quantität der renalen Transporter NCC, ENaC, ROMK und NKCC2 sowie der regulierenden Proteine der Gruppe der WNK Kinasen, SGK, GRP58 und CHIF analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Tabelle 1a: *Verwendete allgemeine Laborgeräte*

Gerät	Typenbezeichnung	Firma
Analysewaage	ISO 9001	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav	3850 ELC	Tuttnauer Systec Ltd., NY, USA
Bioanalyzer	Typ 2100	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Elektrophorese- kammer	Elektrophoresis Power Supply EPS 600	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Glaspipette	Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG, Eberstadt
Polytron- Homogenisator	Thyristor Regler TR50	Janke & Kunkel, IKA- Werke, Wilmington, NJ, USA
PCR-Gerät	Gene Amp PCR System 2400	Perkim Elmer, Norwalk CT, USA
pH-Meter	pH-Meter 320	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Photometer	Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Pipetten	Pipetman P2, P10, P20, P200, P1000	Gilson, Middleton, WI, USA

Tabelle 1b: *Verwendete allgemeine Laborgeräte*

Gerät	Typenbezeichnung	Firma
Präzisionswaage	440-33N	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Real-time-PCR-Gerät	Light Cycler	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Schwannenhalsleuchte	KL 1500 LCD	Schott AG, Mainz
Speed Vac	Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg
Thermoblock	TB1	Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer	5436	Eppendorf AG, Hamburg
UV-Leuchttisch	-	Biometra GmbH, Göttingen
Vortexer	MS2 Minishaker	Janke & Kunkel, IKA-Werke, Wilmington, NJ, USA
Zentrifugen	Centrifuge 5417C	Eppendorf GmbH, Hamburg
	Centrifuge 5417R	Eppendorf GmbH, Hamburg
	Biofuge pico	Heraeus Instruments GmbH, Osterode
	Biofuge stratos	Heraeus Instruments GmbH, Osterode

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: *Verwendete Verbrauchsmaterialien*

Material	Produktbezeichnung	Firma
Auslaufpipetten	Serological Pipet 10 ml	Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Pipettenspitzen	Safe-seal-Tips: 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Biozym Biotech Trading GmbH, Wien, Austria
Mikroreaktionsgefäße	1,5 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht
	2 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht
	PCR-Tubes 0,2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
	Safe-Lock-Tubes 0,5 ml für Agilent	Eppendorf AG, Hamburg
Real-time PCR Kapillaren	Light Cycler Capillaries (20 µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Tubes	Cellstar 50 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Austria
Zentrifugenröhrchen	Röhren Tubes 4 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3a: *Verwendete Chemikalien*

Bezeichnung	Hersteller
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Diethyl-Pyrocarbonat, approx. 97% NMR	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Bovine Serum Albumin (BSA), pH 7,0	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Essigsäure (Eisessig)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 100% und 70%	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ethidiumbromid 95%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA (Dinatriumsalz-Dihydrat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin, 5 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Guanidinthiocyanat (GTC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
2-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt

Tabelle 3b: *Verwendete Chemikalien*

Bezeichnung	Hersteller
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Saures Phenol, Wasser gesättigt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sodium-N-lauroyl-sarcosinate (Sarcosyl)	Merck KGaA, Darmstadt
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (TRIS)	Invitrogen Ltd., Parsley, Scotland, UK

2.1.4 Enzyme

Tabelle 4a: *Verwendete Enzyme*

Bezeichnung	Hersteller
Collagenase Type 2 (315 u/mg)	Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA
Desoxyribonuclease I (50 U/μl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
M-MLV Reverse Transkriptase (50,000 U, 200 U/μl)	Promega, Madison, WI, USA
RNasin Ribonuclease Inhibitor (10,000 U, 40 U/μl)	Promega, Madison, WI, USA

Tabelle 4b: *Verwendete Enzyme*

Bezeichnung	Hersteller
Soybean trypsin inhibitor Type II-S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Taq DNA Polymerase (250 U, 1 U/μl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.1.5 Biochemikalien

Tabelle 5: *Verwendete Biochemikalien*

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Invitrogen Ltd., Parsley, Scotland, UK
DNA Ladder 100 bp (1,0 μg/μl)	Invitrogen Ltd., Parsley, Scotland, UK
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, each at final concentration of 100 mM)	Fermentas Intern. Inc., Burlington, Canada
Eagle´s minimal essential medium (MEM)	Biochrom AG, Berlin
5x First Strand buffer M-MLV RT	Promega, Madison, WI, USA
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer (0,5 μg/μl)	Invitrogen Ltd., Parsley, Scotland, UK
PCR Puffer (10x Conc., mit MgCl ₂)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Primer	MWG-Biotech AG, Ebersberg
total RNA (5μg/μl in DEPC-Wasser)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.1.6 Kit

Tabelle 6: *Verwendete Kits*

Bezeichnung	Hersteller
Actin-PCR	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNA 6000 Nano LabChip-Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
RT Kit	Promega, Madison, WI, USA
QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit	QUIAGEN GmbH, Hilden

2.1.7 Lösungen, Puffer

Tabelle 7a: *Verwendete Lösungen und Puffer*

Bezeichnung	Zusammensetzung
DEPC-Wasser	800 ml H ₂ O 800 µl DEPC
EDTA (0,5 M)	93,05 g EDTA auf 500 ml mit DEPC-Wasser, mit ca. 10 g NaOH-Plätzchen auf pH 8 einstellen
Loading Puffer	50% Glycerol 1% Bromphenolblau, gesättigt 1% Xylenecyanol (10%ig) 2% 50x TBE H ₂ O, steril ad 100ml

Tabelle 7b: Verwendete Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lösung D	500 g Guanidinium Thiocyanat (4 M) 35,2 ml Natriumcitrat (25 mM, pH 7) 17,6 ml Sarcosyl 586 ml DEPC-Wasser 360 µl Mercaptoethanol pro 50 ml Lösung D
Natriumcitrat	55,14 g Natriumcitrat mit DEPC-Wasser auf 250 ml auffüllen mit ca. 6,0 ml 1M HCl auf pH 7 einstellen
2 M Natriumacetat	54,43 g Natriumacetat, mit ca. 75 ml Eisessig auf pH 4,8 bis 5,2 einstellen
Nukleotidmix dNTP (Endkonzentration 2,5 mM für RT und PCR)	25 µl je Nukleotid (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 900 µl DEPC-Wasser
Sarcosyl (30%-ig)	30 g Sarcosyl 100 ml DEPC-Wasser
Stopplösung (1%-ig)	0,6 g BSA 60 ml MEM
1x TBE-Puffer:	100 ml 5x TBE-Puffer 400 ml H ₂ O
5x TBE-Puffer:	54 g TRIS 27,5 g Borsäure 20 ml EDTA (0,5 M, pH 8) auf 1000 ml mit H ₂ O auffüllen

Tabelle 7c: *Verwendete Lösungen und Puffer:*

Bezeichnung	Zusammensetzung
Verdaulösung	12,5 mg Collagenase 11 mg Glycin 1,2 mg Trypsin Inhibitor 25 µl DNase 25 ml MEM

2.2 Methoden

2.2.1 Kaliumdiäten der Tiere

Die Tierexperimente wurden gemäß den geltenden Vorschriften unter der Genehmigungsnummer 10/07 durchgeführt. Es wurden zwei bis drei Monate alte männliche C57bl6 Wildtyp-Mäuse und homozygote BK β 1-Knock-out-Mäuse untersucht, die ein Durchschnittsgewicht von 25 g aufwiesen. Die genotypisierten Mäuse stammten aus der Zucht des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg.

Die Mäuse wurden in sechs verschiedene Gruppen von sechs bis acht Tieren aufgeteilt und 14 Tage lang mit unterschiedlicher Diätkost (0,05%, 0,93% und 5% Kalium und jeweils 0,24% Natrium, Firma Sniff) bei freiem Zugang zu Wasser versorgt:

Tabelle 8: Gruppeneinteilung der Tiere unter Kaliumdiät

Gruppe	Tiere
1	Wildtyp-Mäuse mit normaler Standarddiät (0,93% Kalium)
2	Wildtyp-Mäuse mit kaliumarmer Diät (0,5% Kalium)
3	Wildtyp-Mäuse mit kaliumreicher Diät (5% Kalium)
4	BK β 1-Knock-out Mäuse mit Standarddiät (0,93% Kalium)
5	BK β 1-Knock-out Mäuse mit kaliumarmer Diät (0,5% Kalium)
6	BK β 1-Knock-out Mäuse mit kaliumreicher Diät (5% Kalium)

Den Mäusen für den Untersuchungsteil der Mikrodissektion wurde eine Standardkost mit 0,93% Kalium gegeben.

2.2.2 Schutzmaßnahmen bei der RNA-Isolierung

Aufgrund der Gefahr, dass stabile und ubiquitäre RNasen die RNA-Proben abbauen könnten, wurden folgende Schutzmaßnahmen getroffen, um ein RNase-freies Arbeiten zu ermöglichen:

Alle verwendeten Glasgefäße wurden für mindestens 10 Stunden in einem 180°C heißen Hitzeschrank ausgeglüht, um auch die gegen das Autoklavieren resistenten RNasen zu zerstören. RNase-freies Wasser wurde durch den Zusatz von DEPC-Lösung gewonnen. Dafür wurde das mit DEPC angereicherte (0,1%) Wasser über Nacht unter den Abzug gestellt und anschließend bei 121°C und 2 bar für 15 Minuten autoklaviert. Das so gewonnene RNase-freie DEPC-Wasser wurde anschließend für alle angesetzten Lösungen verwendet.

Die Zentrifugenröhrchen wurden ebenfalls - in DEPC-Wasser getaucht - autoklaviert und es kamen nur sterile, RNase-freie verpackte Verbrauchsmaterialien (Eppendorf Cups, Pipettenspitzen) zum Einsatz.

Des Weiteren wurde durch das Tragen von Latex-Handschuhen das Übertragen der RNasen der Haut auf das Probenmaterial verhindert.

Um das Ausmaß einer eventuell dennoch stattfindenden RNase-Dekontamination zu verringern, wurden die Arbeitsgänge stets auf Eis gekühlt vorgenommen sowie Kühlzentrifugen verwendet.

2.2.3 Dissektion der Niere und Isolierung der Nierenzonen-RNA

Nach einer 14-tägigen experimentellen Diätversorgung mit Spezialfutter wurden die Mäuse mit CO₂ betäubt und dekaptiert (vorgenommen durch Dr. Vitzthum). Die Nieren wurden den Tieren sofort entnommen, mit Hilfe eines länglichen Kapseleinschnitts an der äußeren Nierenkurvatur entkapselt und auf einer eisgekühlten Metallunterfläche manuell mit einem Skalpell in fünf gleich breite Längsstreifen zerteilt. Unter dem Binokular erfolgte dann die Zonierung der Streifen in Kortex (cortex, C), äußeres Mark (outer medulla, OM) und inneres Mark inklusive Papille (inner medulla, IM). Sofort nach der

Dissektion wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff heruntergekühlt und bei -80 °C bis zur weiteren Isolierung aufbewahrt.

Die RNA-Isolierung wurde nach einem modifizierten Verfahren gemäß dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt. Das zonierte Nierengewebe (C, OM bzw. IM) wurde jeweils in einem Zentrifugenröhrchen mit 4 ml Lösung D (360 µl Mercaptoethanol pro 50 ml Guanidinthiocynat), die zur Proteindenaturierung dient, mit einem Polytron-Homogenisator homogenisiert. Anschließend wurden folgende Reagenzien nacheinander hinzugefügt und jeweils mit dem Vortex gut vermischt:

- 400 µl (1/10 Vol) Natriumacetat (2 M, pH 4,8)
- 4 ml (1 Vol) saures Phenol, Wasser gesättigt
- 800 µl (2/10 Vol) Chloroform.

Es erfolgte eine 15-minütige Proteinfällung auf Eis. Anschließend wurde die Suspension (gekühlt) bei 10.000 Umdrehungen für 15 Minuten zentrifugiert. Die sich dabei abtrennende obere wässrige Phase mit der enthaltenen RNA wurde vorsichtig von der unteren Phase mit den Proteinresten und der DNA abpipettiert und mit 4 ml Isopropanol (100%) vermischt. Nach mindestens einer weiteren Stunde bei -20 °C, in der es zur RNA-Fällung kam, wurde die Suspension erneut unter Kühlung bei 10.000 Umdrehungen 20 Minuten lang zentrifugiert. Der Flüssigkeitsüberschuss wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Die RNA, die sich in Form eines Pellets am Zentrifugenröhrchenboden abgesetzt hatte, wurde mit 400 µl Lösung D mit Mercaptoethanol resuspendiert und in 2 ml RNase-freie Eppendorf Tubes überführt. Nachfolgend wurden jeweils 40 µl Natriumacetat (2 M) und 440 µl (1 Vol) Ethanol unter kräftigem Vortexen hinzugefügt. Die Lösung wurde für eine weitere Stunde zur RNA-Fällung bei -20 °C kühl gestellt und daraufhin wieder für 20 Minuten bei 10.000 Umdrehungen gekühlt zentrifugiert. Anschließend wurde der Flüssigkeitsüberstand erneut mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Pellets etwa 15 Minuten in der Vakuumzentrifuge getrocknet, um das Ethanol vollständig zu entfernen. Mit 50 µl DEPC-Wasser wurde das RNA-Pellet resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.4 OD-Vermessung der isolierten Nieren-RNA

Die Konzentration der gewonnenen Nieren-RNA wurde photometrisch durch die Messung der optischen Dichte bei 260 nm im UV-Photometer bestimmt. Ein gemessener OD₂₆₀-Wert von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Zusätzlich wurde über das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ die Reinheit der RNA-Präparation bestimmt. Ein hoher Wert zeigt an, dass wenige Verunreinigungen mit Proteinen vorliegen. Die Messung erfolgte nach 100-facher Verdünnung der RNA-Probe mit H₂O in einer Quarzküvette. Als Referenz diente reines Wasser.

2.2.5 Agilent-Vermessung der isolierten Nieren-RNA

Um die Konzentration der einzelnen Nieren-RNA-Lösungen exakt zu bestimmen, wurden die verschiedenen Proben im Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies) vermessen. Dabei wurde mit dem RNA 6000 Nano LabChip-Kit (Agilent) gearbeitet, mit dem bis zu 12 Proben pro Chip vermessen werden können. Mit Hilfe der zuvor im UV-Photometer ermittelten Konzentrationen wurden alle RNA-Proben mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 0,3 µg/µl eingestellt, um im vorgeschriebenen Messbereich des Kits (25-500 ng/µl) zu bleiben.

Zur Vorbereitung des Gels wurden 550 ml der RNA 6000 Nano Gel Matrix in einem Spinfilter 10 Minuten lang zentrifugiert (1500 Umdrehungen) und 65 ml-Aliquots hergestellt. Zu diesen wurden jeweils 1 µl RNA 6000 Nano Dye Concentrate hinzupipettiert, das zuvor gut gemischt und zentrifugiert worden war. Nach dem Vortexen erfolgte die Zentrifugierung des Gel-Dye-Mix für 10 Minuten bei 13.000 Umdrehungen. Anschließend wurde der RNA Chip - wie vom Hersteller vorgegeben - mit dem Gel-Dye-Mix und dem RNA 6000 Nano Marker beladen. Die RNA-Proben (1µl) und ein mitgeführter Standard wurde in die Chip-Wells pipettiert und der RNA 6000 Nano Chip bei 2.400 rpm für exakt eine Minute gevortexet. Nach Einlegen des Chips in den Agilent 2100 Bioanalyser wurde der Lauf gestartet.

Über einen Fluoreszenzdetektor wurden die RNA-Fragmente und deren Laufzeiten registriert. Der Bioanalyser generiert aus den Daten sowohl ein Elektropherogramm als auch gelähnliche Bilder.

2.2.6 Mikrodissektion

Nach dem modifizierten Verfahren von Schafer et al. (1997) wurden einzelne isolierte Nephronabschnitte - distaler konvoluter Tubulus (DCT) der Henle Schleife und Verbindungstubulus/kortikales Sammelrohr (CT/CCD) - gewonnen.

Die Wildtyp- bzw. BK β 1-Knock-out-Versuchstiere unter Standarddiät (Gruppe 1 bzw. 4) wurden nach erfolgter CO₂-Betäubung dekaptiert (vorgenommen durch Dr. Vitzthum), die Niere sofort entnommen und entkapselt. Unter dem Binokular wurde die Niere auf Eis in Kortex und Mark mit einem Skalpell zioniert. Der so gewonnene Kortex-Zonenabschnitt wurde radiär, längs der Tubuli in ca. 2,5 mm breite Stücke zerschnitten und mit 2 ml Verdauungslösung in ein ca. 37 °C warmes Wasserbad gestellt.

Die Verdauungslösung (25 ml Ansatz pro Nierenzone) setzte sich zusammen aus:

- 12,5 mg Collagenase
- 9,4 mg Glycin
- 1,2 mg Trypsin Inhibitor
- 25 ml MEM.

Pro 1 ml Collagenase-MEM-Lösung erfolgte die Zugabe von 1 μ l DNase.

Nach 20-minütiger Inkubationszeit wurde der Flüssigkeitsüberstand mit Hilfe einer Glaspipette abgenommen und in 2 ml Stopplösung (1% BSA-MEM-Lösung) auf Eis pipettiert. Mit dem verbliebenen Geweberückstand wurden die beschriebenen Arbeitsschritte bis zu sieben weitere Male durchgeführt, beginnend mit der Zugabe von 2 ml frischer Collagenase-Lösung. Nach 15 Minuten Sedimentationszeit wurde der Überstand verworfen und dem ca. 2 cm hohen verbliebenen Satz der Nephronsegmente 2 ml eisgekühlte Sammellösung (0,5% BSA-MEM-Lösung) hinzugefügt. Zur Dissektion der einzelnen Nephronstrukturen wurde die Sammellösung in ein

Plexiglasschälchen auf Eis pipettiert. Unter dem Binokular (maximale Vergrößerung 100fach) erfolgte die Sortierung der einzelnen Tubuliabschnitte nach unterschiedlicher Form, Farbe und Struktur. Hierfür wurde eine Nadel, hergestellt durch Einschmelzen eines Drahtes in eine Glaspipettenspitze, verwendet. Die Nephronsegmente wurden in eine saubere Ecke der Schüssel sortiert und mit einer Glaspipette in eine neue Plexiglaschale mit 0,25% BSA-MEM-Lösung überführt. Die gesammelten Tubuliabschnitte (mit einer Gesamtlänge von mindestens 11 mm pro Nephronabschnitt) wurden anschließend in 400 µl GTC-Mercaptoethanol-Lösung, die zur Proteindenaturierung dient, transferiert und bei -80 °C bis zur folgenden RNA-Isolierung aufbewahrt.

2.2.7 RNA-Isolierung der Nephrontubuli

Die in 400 µl Lösung D mit Mercaptoethanol aufbewahrten gesammelten Nephronsegmente wurden mit 5 µl tRNA versetzt. Anschließend wurden 50 µl Natriumacetat (2 M) hinzu pipettiert und kräftig vermischt. Die folgenden 400 µl saures-Wasser-gesättigtes-Phenol (1 Vol) und 80 µl Chloroform dienten dazu, dass sich die denaturierten Proteine in dieser Phase von der RNA der Tubuli abscheiden. Nach erneutem kräftigen Vermischen und einer Phase von 15 Minuten auf Eis erfolgte das Abzentrifugieren der Chlor-Phenol-Phase (20 Minuten bei 10.000 Umdrehungen in einer Kühlzentrifuge). Etwa 400 µl der oberen Phase mit der RNA oberhalb der Chlor-Phenol-Phase wurden in 500 µl Isopropanol (100%) überführt und eine Stunde lang bei -20 °C gefällt. Nach dem erneuten 20-minütigen Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes mit einer Pasteurpipette wurde das sich am Zentrifugenröhrenboden absetzende RNA-Pellet mit 70%-Ethanol (500 µl) gewaschen, erneut für 20 Minuten gekühlt zentrifugiert und im Speed Vac für ungefähr 15 Minuten unter Vakuum getrocknet. In 9 µl RNase-freiem Wasser erfolgte die Resuspendierung der so gewonnenen RNA.

2.2.8 Reverse Transkriptase (RT)

Die Synthese der cDNA aus der gewonnenen RNA erfolgte mittels der Reverser Transkriptase M-MLV von Promega. Dabei unterschied sich das Vorgehen bei der Nierenzonen-RNA und den mikrodisssektierten Nephron-Tubuliabschnitten nur in der eingesetzten Menge der RNA.

Zu Beginn wurde in ein Eppendorf Tube (1,5 ml) 0,3 µg der isolierten RNA der Nierenzonenabschnitte bzw. 9 µl der isolierten Tubuli-RNA vorgelegt und anschließend mit 1 µl pdT (0,5 µg/ml) vermischt. Die auf 10 µl mit H₂O aufgefüllten Proben wurden für fünf Minuten bei 65°C im Thermoblock denaturiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis und Herunterzentrifugieren der kondensierten Tröpfchen wurde zu jeder RNA-Probe der folgende Reaktionsansatz hinzu pipettiert:

- 4 µl dNTP (2.5 mM)
- 4 µl 1stStrand Puffer (5x)
- 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) Promega
- 0,5 µl RNasin Promega
- 2,5 µl DEPC H₂O.

Der Reaktionsmix wurde kurz gevortexet und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze noch zwei Minuten lang in einem 94°C heißen Thermoblock erhitzt, um die Reverse Transkriptase zu deaktivieren. Die transkribierten cDNA-Proben wurden bei -20°C für die weiteren Analysen aufbewahrt.

Die Negativkontrollen umfassten eine Wasserprobe und eine tRNA-Probe (als Carrier in der RNA-Isolation benutzt) mit keiner weiteren Zugabe von RNA in der reversen Transkription. Weiterhin wurden zu Kontrollzwecken eine RNA-Probe ohne Zugabe der Reversen Transkriptase im Reaktionsansatz verwendet (im Folgenden als „-RT-Probe“ bezeichnet).

2.2.9 Actin-PCR

Für die Kontrolle der RNA-Isolation und der RT sowie zur Abschätzung der cDNA-Konzentration der einzelnen Tubuliabschnitte (DCT und CT/CCD) wurde die gewonnene cDNA mit Hilfe der Actin-Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert. Verwendet wurde die Taq-DNA-Polymerase von Roche. Zur Negativkontrolle wurden ebenfalls die tRNA-, „-RT“- und Wasserproben mit eingesetzt.

Folgender Reaktionsansatz wurde für jede Probe gewählt:

- 2 µl dNTP (2.5 mM)
- 2 µl PCR-Puffer
- 1 µl sense Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl antisense Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl Taq-Polymerase
- 11 µl H₂O.

Die PCR-Amplifikation wurde mit folgenden Primern (MWG) durchgeführt:

- sense Primer 5'-CGG-GAT-CCC-CGC-CCT-AGG-CAC-CAG-GGT-3'
- antisense Primer 5'-GGA- ATT-CGC-CTG-GGG-TGT-TGA-AGG-TCT-CAA-A-3'.

Von jeder cDNA-Probe wurden 2 µl mit den 18 µl des Reaktionsansatzes in einem 1,5 ml Cup vermischt und anschließend amplifiziert.

Das PCR-Programm vollzog 30 Zyklen mit den folgenden Programmschritten:

1. Denaturierung bei 94 °C: 30 s
2. Hybridisierung bei 60 °C: 30 s
3. Extension bei 72 °C: 30 s.

Am Ende der 30 Zyklen erfolgte eine Abkühlung auf 4 °C.

Die PCR-Produkte wurden durch eine elektrophoretische Auftrennung der Proben in einem 2%-Agarosegel nachgewiesen.

2.2.10 Agarosegelelektrophorese

Für die Elektrophorese wurde ein Gel mit einer Agarosekonzentration von 2% verwendet. Hierfür wurde 1 g Agarosegel eingewogen und durch Aufkochen in einer Mikrowelle (ca. 2 min bei 440 W) in 50 µl TBE-Puffer (0,5%) gelöst. Anschließend wurde 1 µl Ethidiumbromid-Lösung zugegeben und das Gel in einen Gelträger gegossen; ein Kamm diente dabei zur Formung der Geltaschen. Nach ca. 15 Minuten war das Gel so weit erkaltet und verfestigt, dass es samt Gelträger in die mit TBE-Puffer (0,5%) gefüllte Elektrophoresekammer eingebracht wurde. Die aufzutrennenden cDNA-Proben vom DCT und CT/CCD, die tRNA-Probe, eine Standardreihe (1 µg, 0,1 µg bzw. 0,01 µg einer Maus-Niere) sowie eine „-RT“- und Wasserprobe wurden nach Versetzen mit jeweils 2 µl Ladepuffer in je eine Geltasche aufgetragen. In einer weiteren Kammer wurde darüber hinaus der Längenstandard pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 110 V; die Laufzeit betrug dafür hat ca. 45 Minuten. Die Detektion der Banden erfolgte unter Zuhilfenahme einer UV-Lampe. Zur Dokumentation wurde ein digitales Foto angefertigt und auf dem Computer gespeichert. Anhand eines Vergleichs mit dem mitgeführten Standard wurden die Konzentrationen der isolierten Nephron-Tubuliabschnitte abgeschätzt.

2.2.11 Real-time PCR

Die Real-time PCR wurde am Light Cycler (Roche) durchgeführt. Bei allen PCR Experimenten wurde das QuantiTect® SYBR® Green Kit (Qiagen) eingesetzt, das mit SYBR Green eine interkalierende Substanz besitzt, die eine Messung der Fluoreszenz erlaubt.

Für jede cDNA-Probe wurde der folgende Reaktionsansatz auf Eis zusammen pipettiert:

- 10 µl Master Mix Quiagen
- 1 µl sense Primer (10 pmol/µl)

- 1 µl antisense Primer (10 pmol/µl)
- 6 µl RNase-free water Quiagen.

Nach dem Vortexen und Zentrifugieren wurden 18 µl Reaktionsgemisch zu 2 µl cDNA der Probe in die Light Cycler Kapillare pipettiert. Die Probenansätze wurden bei 2.800 Umdrehungen herunterzentrifugiert und danach in den Light Cycler eingesetzt. Dabei wurden jeweils folgende Primerpaare verwendet:

Tabelle 9a: Verwendete Primerpaare in der Real-time PCR

	Primer sense	Primer antisense
L32	L32-Intron/for	L32-Intron/rev
	5'-CGG GAT GGA GCT GGA GGT GCT GCT GA-3'	5'-GGA ATT CGC CAG CTG TGC TGC TCT TTC-3'
NCC	m-NaCl/3	m-NaCl/4
	5'-CGG GAT AAT GGC AAG GTC AAG TCG-3'	5'-GGA ATT CTG ATG CGG ATG TCA TTG ATG G-3'
ENaC-α	m-ENaC-a/1	m-ENaC-a/2
	5'-CGG GAT CCC GGC ATG ATG TAC TGG CAG-3'	5'-GGA ATT CGC CTG GCG AGT GTA GGA AG-3'
ENaC-β	m-ENaC-b/3	m-ENaC-b/4
	5'-CGG GAT CCA TGT GGT TCC TGC TTA CGC TG-3'	5'-GGA ATT CGT CCT GGT GGT GTT GCT GTG-3'
ENaC-γ	m-ENaC-g/3	m-ENaC-g/4
	5'-CGG GAT CCA AAG CCA GCA AAT AAA CAA A-3'	5'-GGA ATT CGC GGC GGG CAA TAA TAG AGA-3'
ROMKall	m-ROMKall/1	m-ROMKall/2
	5'-CGG GAT CCG GCA CTG ACA GAA AGG ATG-3'	5'-GGA ATT CCA GGT CAA GTA CAG TTG TCC-3'

Tabelle 9b: Verwendete Primerpaare in der Real-time PCR

	Primer sense	Primer antisense
Na-K-ATPase α 1-sub	α 1-NaKATPase/3	α NaKATPase/4
	5'-CGG GAT CCG CCA TAC AGC GTT CTT TGT C-3'	5'-GGA ATT CGC TTC CGC ACC TCG TCA TAC-3'
SGK1	m-SGK1-3	m-SGK1-4
	5'-CGG GAT CCC GAG GCT GCT CGA AGC AC-3'	5'-GGA ATT CGA GGA CGG ACC CAG GTT G-3'
KS-WNK1	WNK1-kid1	WNK1-kid2
	5'-CGG GAT CCC TTC CTT ATG CTG TGG GCT AG-3'	5'-GGA ATT CGT CAA AAC TGG CTG GCT TCA C-3'
L-WNK1	L-WNK1-for3	L-WNK1-rev4
	5'-CGG GAT CCG AAA CCA CTG TGG AAG TCG-3'	5'-GAA TTC GGT TCA GTC ACT AAA ACA ATG C-3'
WNK4	WNK4-3	WNK4-4
	5'-CGG GAT CCG AGG CTG TGG ATG TGT ACG C-3'	5'-GGA ATT CCC GTG CGG ATG CAG CCT TC-3'
CHIF	m-CHIF/1	m-CHIF/2
	5'-CGG GAT CCG GCC TTG GAA GCC AGT GAC C-3'	5'-GGA ATT CCT GGA ATG ATG ATG GGA GTG-3'
GRP58	m-GRP58-1	m-GRP58-2
	5'-CGG GAT ACC GCT TAC TAT GAT GTG GAC TAT G-3'	5'-GGA ATT CAG GCC CTT CGT TGG ACT CTG-3'

Das PCR Programm wurde mit einem zehnmütigen Zyklus bei 95 °C („Hot Start“) zur Aktivierung der Taq-Polymerase gestartet, gefolgt von der Amplifikation (40 bis 50 Zyklen), mit 94 °C Denaturierung für 15 Sekunden, 60 °C Annealing-Temperatur für 30 Sekunden und 72 °C Extension für 12-15

Sekunden. Dabei wurde die Dauer des 72°C-Schrittes in Abhängigkeit von der Produktlänge zwischen 12 und 15 Sekunden gewählt. Nach der Amplifikation erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse, die dazu dient, die Genauigkeit des Amplifikats zu verifizieren und gegebenenfalls unspezifische Nebenprodukte aufzudecken.

Die Analyse der Daten wurde mit der Light Cycler Software Version 3.5 durchgeführt.

In jedem Lauf wurde eine interne Standardkurve mit Hilfe einer Verdünnungsreihe einer Nieren-cDNA einer Wildtyp-Maus berechnet. Dieses erlaubt den Vergleich der unterschiedlichen PCR Effizienzen zwischen den Läufen. Eine Negativprobe mit „-RT“ (bei den Kaliumdiät-Proben) bzw. tRNA (bei den Mikrodisektionsproben) sowie Wasser anstelle von cDNA wurde bei jeder PCR eingesetzt, um die Spezifität der Reaktion abzuschätzen. Die insgesamt 48 cDNA-Proben der sechs Mäuse-Untersuchungsgruppen mit den verschiedenen Kaliumdiäten wurden in zwei Serien aufgeteilt. Jeder Real-time PCR-Lauf einer Serie umfasste damit insgesamt 32 Proben:

Table 10a: Probenreihenfolge in der Real-time PCR

Probennummer	cDNA
1-4	Wildtyp-Mäuse Normaldiät
5-8	Wildtyp-Mäuse kaliumarme Diät
9-12	Wildtyp-Mäuse kaliumreiche Diät
13-16	BK β 1-KO-Mäuse Normaldiät
17-20	BK β 1-KO-Mäuse kaliumarme Diät
21-24	BK β 1-KO-Mäuse kaliumreiche Diät

Tabelle 10b: Probenreihenfolge in der Real-time PCR

Probennummer	cDNA
25	1 µg Standardreihe
26	0,5 µg Standardreihe
27	0,2 µg Standardreihe
28	0,1 µg Standardreihe
29	0,05 µg Standardreihe
30	0,02 µg Standardreihe
31	Negativprobe „-RT“
32	Negativprobe Wasser

Für die Real-time PCR-Läufe mit den Nephrontubuliabschnitten aus der Mikrodisektion wurde die DCT cDNA von fünf Wildtyp-Mäusen und vier BK β 1-Knock-out Mäusen eingesetzt. Für die Analyse der CT/CDD cDNA wurden jeweils drei Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäuse verwendet, deren cDNA jeweils gepoolt worden waren. Damit ergab sich folgende Probenreihenfolge bei der Real-time PCR:

Tabelle 11a: Probenreihenfolge in der Real-time PCR bei den Mikrodisektionsproben

Probennummer	cDNA
1-5	DCT von Wildtyp-Mäusen
6-9	DCT von BK β 1-KO-Mäusen
10-12	CT/CCD von Wildtyp-Mäusen
13-16	CT/CCD von BK β 1-KO-Mäusen
17	1 µg Standardreihe
18	0,5 µg Standardreihe
19	0,2 µg Standardreihe

Tabelle 11b: Probenreihenfolge in der Real-time PCR bei den Mikrodissektionsproben

Probennummer	cDNA
20	0,1 µg Standardreihe
21	0,05 µg Standardreihe
22	0,02 µg Standardreihe
23	0,01 µg Standardreihe
24	Negativprobe tRNA
25	Negativprobe Wasser

Im Rahmen der Kaliumdiätanalyse wurden alle oben genannten Primerpaare in den Real-time PCR-Läufen eingesetzt. Die aus der Mikrodissektion gewonnenen cDNA-Proben der Tubuliabschnitte wurden jeweils mit den Primerpaaren für L32, NCC, ENaC β und KS-WNK1 amplifiziert.

2.2.12 Statistik

Alle Ergebnisse werden als Mittelwert plus Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Alle Probenergebnisse der PCR-Amplifikation beziehen sich auf die zuvor im Agilent gemessene Konzentration der jeweiligen RNA-Probe, so dass eine Konzentrationsangabe von mRNA/ μ g der jeweiligen Probe berechnet werden konnte. Damit die quantitative Analyse der Real-time PCR-Produkte der Mikrodissektion unabhängig von eventuellen Mess- und Pipettierfehlern ist, beziehen sich alle Probenergebnisse der PCR-Amplifikation der Mikrodissektion auf die Menge des zuvor ermittelten Haushaltsgens L32 der jeweiligen Proben-mRNA.

Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der sechs Tiergruppen wurden mit einer multivariaten Varianzanalyse (ANOVA) und dem Post-hoc-Test „Newman-Keuls Comparison Test“ ermittelt (GraphPad Prism Version 4.03). Signifikanzen zwischen den zwei Gruppen der Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen unter Standardkaliumdiät wurden mit einem univariaten Student's

t-test ermittelt. Dabei wurde die jeweilige Aussage als signifikant angesehen, sobald der zugehörige *p*-Wert unterhalb von 5% liegt.

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich von Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen

Im ersten Abschnitt der Untersuchungen wurden die möglichen Folgen eines erhöhten Aldosteronwertes in Bezug auf den Natriumtransporter NCC, den Natriumkanal ENaC β und den Kaliumkanal ROMK im kortikalen distalen Nephron ermittelt. Des Weiteren wurden die Expression der WNK Kinasen KS-WNK1, L-WNK1 und WNK4 untersucht. Es sollte eine mögliche Abhängigkeit der mRNA Expression von Plasmaaldosteron analysiert werden. Ebenfalls wurde die SGK1 Kinase, die als weiteres Ziel der Aldosteronwirkung in der Niere gilt (Naray-Fejes-Toth et al. 1999), betrachtet. Als Versuchsmodell dienten eine Gruppe von Wildtyp-Mäusen sowie eine Gruppe von BK β 1-Knock-out-Mäusen, die allesamt eine Standarddiät (0,93% Kalium, 0,24% Natrium) erhielten. Diese BK β 1-Knock-out-Mäuse weisen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen einen chronisch erhöhten Plasmaaldosteronspiegel mit Hypokaliämie und Hypertonie auf (Plüger et al. 2000).

3.1.1 Ergebnisse der Real-time PCR-Analyse des Kortexabschnittes

In den abgebildeten Diagrammen werden die in der Real-time PCR ermittelten mRNA-Mengen der Transporter und Kinasen auf die im Agilent ermittelten RNA-Mengen der jeweiligen Proben bezogen. Die Mittelwerte und die Fehler der Mittelwerte (Mittel \pm SEM) beziehen sich dabei auf acht Wildtyp- bzw. sieben BK β 1-Knock-out-Tiere, die in den Diagrammen als „WT-“ bzw. „KO“-Mäuse bezeichnet werden.

Hinsichtlich des Natriumchloridcotransporters (NCC) zeigte sich bei den BK β 1-Knock-out-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen eine Tendenz zur Reduzierung der mRNA-Expression von NCC. Diese nicht signifikante Abnahme betrug durchschnittlich 24% (Abbildung 4).

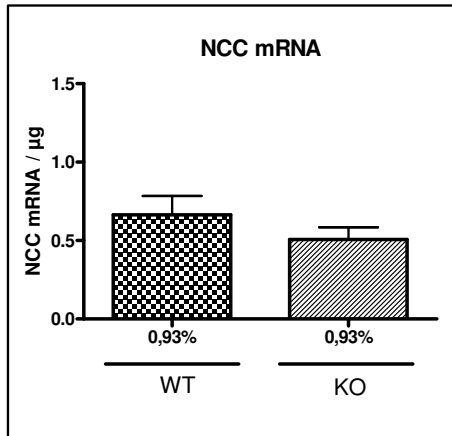


Abb. 4: Stärke der NCC mRNA-Expression bei Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=7-8 Tiere pro Gruppe, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Die NCC mRNA-Expression war bei den BK β 1-Knock-out-Tieren gegenüber der Expression bei den Wildtyp-Tieren tendenziell, aber nicht signifikant verringert (durchschnittlich um 24%).

In Bezug auf die quantitative Expression der mRNA des ENaC β -Kanals (Abbildung 5) ließ sich im Vergleich zwischen Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen kein signifikanter Unterschied feststellen.

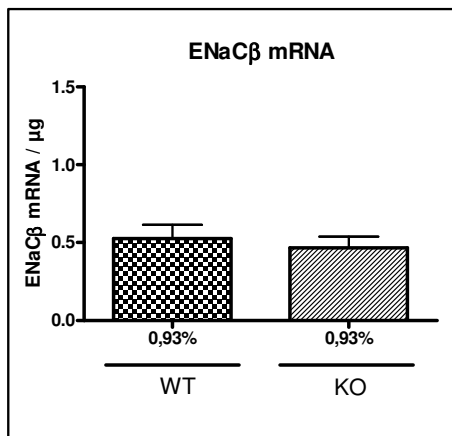


Abb. 5: Stärke der ENaC β mRNA-Expression bei Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=7-8 Tiere pro Gruppe, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Die ENaC β mRNA-Expression unterschied sich zwischen den Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Tieren nicht signifikant.

Zur Klärung der Frage, ob es bei einem höheren Plasmaaldosteronspiegel und einem niedrigen Kaliumspiegel, wie er in BK β 1-Knock-out-Tieren zu finden ist, zu einer veränderten Expression der NCC mRNA gegenüber der ENaC β mRNA kommt, wurden die in der Real-time PCR ermittelten Mengen des NCC-Transporters und des ENaC β -Kanals zueinander ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 6). Dabei zeigte sich bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen im Vergleich zur Gruppe der Wildtyp-Mäuse ein tendenziell leicht niedrigerer Quotient aus durchschnittlicher NCC mRNA zu durchschnittlicher ENaC β mRNA (nicht signifikante Abnahme um 14%). Die BK β 1-Knock-out-Mäuse mit dem höheren Plasmaaldosteronspiegel wiesen also relativ betrachtet eine leichte Tendenz zu einem erhöhten Anteil an ENaC β mRNA-Expression als Wildtyp-Mäuse auf.

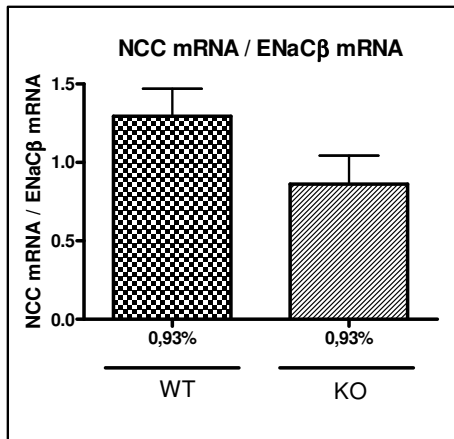


Abb. 6: Relation der durchschnittlichen NCC mRNA-Menge zur durchschnittlichen ENaCβ mRNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=7-8 Tiere pro Gruppe, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Bei den BKβ1-Knock-out-Tieren zeigte sich gegenüber den Wildtyp-Tieren tendenziell eine leichte relative Erhöhung der durchschnittlichen ENaCβ mRNA-Expressionsmenge im Vergleich zur durchschnittlichen NCC mRNA-Expressionsmenge.

Wie in Abbildung 7 dargestellt zeigten die BKβ1-Knock-out-Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen keinen signifikanten Unterschied bei der Expression der mRNA des Kaliumkanals ROMK im Kortex.

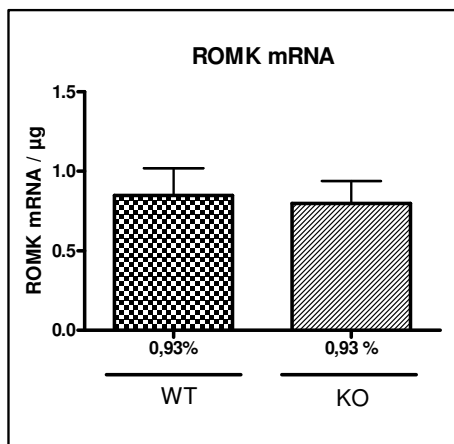


Abb. 7: Stärke der ROMK mRNA-Expression bei Wildtyp- und BKβ1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=7-8 Tiere pro Gruppe, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Die Expression der mRNA von ROMK war bei den BKβ1-Knock-out-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren nicht signifikant verändert.

Die Analyse der Expression der nierenspezifischen KS-WNK1 mRNA im Kortex (Abbildung 8) ergab, dass sich die KS-WNK1 mRNA-Expression nicht signifikant zwischen den Knock-out- und Wildtyp-Tieren unterschied.

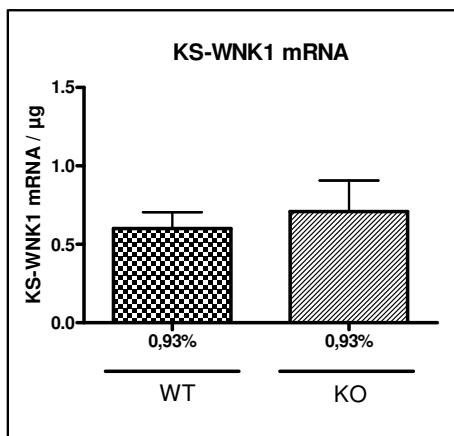


Abb. 8: Stärke der KS-WNK1 mRNA-Expression bei Wildtyp- und BKβ1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=7-8 Tiere pro Gruppe, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Die durchschnittliche Expression der KS-WNK1 mRNA unterschied sich zwischen den BKβ1-Knock-out-Tieren und Wildtyp-Tieren nicht signifikant.

Die L-WNK1 mRNA wurde in den BK β 1-Knock-out- und in Wildtyp-Tieren vergleichbar stark exprimiert. Es war kein signifikanter Unterschied messbar (Abbildung 9).

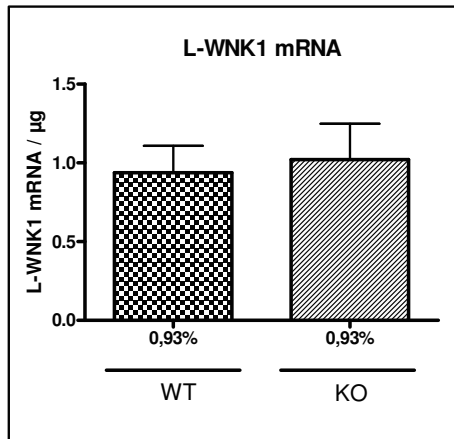


Abb. 9: Stärke der L-WNK1 mRNA-Expression bei Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=7-8 Tiere pro Gruppe, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Die mittlere Expression der L-WNK1 mRNA war zwischen den BK β 1-Knock-out-Tieren und den Wildtyp-Tieren nicht signifikant unterschiedlich.

Das Ergebnis der Real-time-Analyse der WNK4 ist in Abbildung 10 dargestellt. Die BK β 1-Knock-out-Mäuse zeigten hier keine signifikant unterschiedliche WNK4 mRNA-Expression gegenüber den Wildtyp-Mäusen.

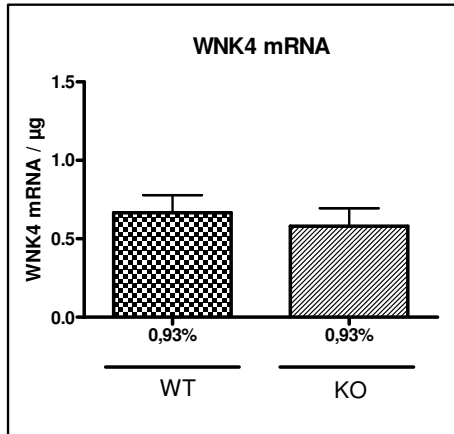


Abb. 10: Stärke der WNK4 mRNA-Expression bei Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=7-8 Tiere pro Gruppe, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Die Expression der WNK4 mRNA war bei den BK β 1-Knock-out-Tieren und den Wildtyp-Tieren nicht signifikant unterschiedlich.

Abbildung 11 zeigt das Analyseergebnis für die SGK1. Die Expression der SGK1 mRNA war bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nicht signifikant unterschiedlich.

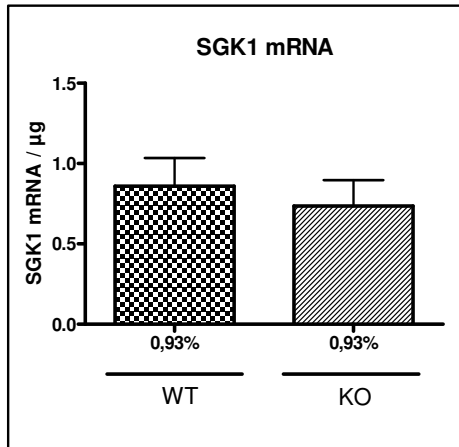


Abb. 11: Stärke der SGK1 mRNA-Expression bei Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=7-8 Tiere pro Gruppe, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Die mittlere Expression der SGK1 unterschied sich zwischen den Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen nicht signifikant.

3.1.2 Ergebnisse der Real-time PCR-Analyse der Mikrodissektion

Zur Ermittlung der quantitativen Expression der mRNA des Natriumchloridcotransporters NCC, des Natriumkanals ENaC β und der KS-WNK1 im distalen Nephron wurden die in der Mikrodissektion gewonnenen distalen Tubuliabschnitte distaler konvoluter Tubulus (DCT), Verbindungstubulus und kortikales Sammelrohr (CT/CCD) mit Hilfe der Real-time PCR analysiert. Die Daten basierten dabei auf fünf Mikrodissektionssammlungen bei den Wildtyp-Mäusen und vier Sammlungen bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen. Nach der Isolation der Tubuliabschnitte sowie der reversen Transkription der RNA in cDNA und Actin-PCR wurden die Proben mit der Gelelektrophorese auf ausreichende cDNA-Menge überprüft, so dass nur Proben mit einem deutlichen Signal in der Real-time PCR verwendet wurden. Die hier angegebenen mRNA Expressionsstärken in den Tubulisegmenten beziehen sich stets auf die ebenfalls gemessenen L32 mRNA Mengen der jeweiligen Probe.

Abbildung 12 zeigt die mRNA Expressionsstärke des Natriumchloridcotransporters NCC im DCT sowie im CT/CCD. Dabei ist zu erkennen, dass der NCC im distalen konvoluten Tubulus bei beiden Tiergruppen stärker exprimiert wurde als im CT/CCD (durchschnittlich um den Faktor 12,4). In diesem Abschnitt ließ sich nahezu keine NCC mRNA Expression mehr nachweisen. Beim Vergleich der NCC mRNA Expression im DCT zwischen

den Wildtyp-Tieren und den BK β 1-Knock-out-Tieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

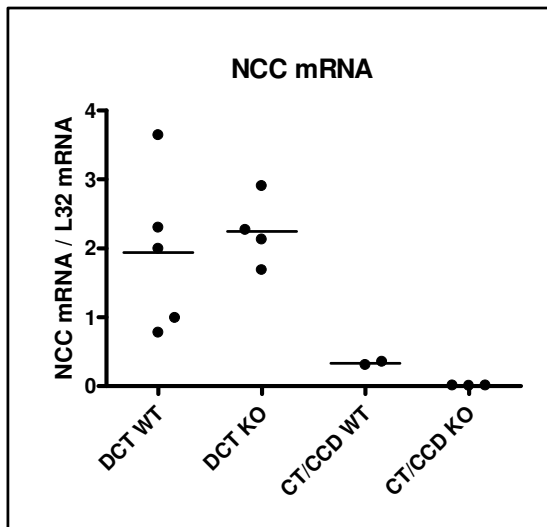


Abb. 12: Stärke der NCC mRNA-Expression im DCT und CT/CCD bei Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die L32 mRNA-Menge

(Messdaten und Mittelwert; $n=4-5$ Tiere pro Gruppe, $^*p<0,05$ One-Way-ANOVA)

Die Expression der NCC mRNA war im DCT durchschnittlich um den Faktor 12,4 gegenüber CT/CDD erhöht. Im CT/CDD-Abschnitt ließ sich bei beiden Tiergruppen nahezu keine NCC mRNA nachweisen.

Bei der PCR-Analyse der mRNA des Natriumkanals ENaC β im distalen konvoluten Tubulus (DCT) und Sammelrohr (CT/CCD) (Abbildung 13) konnte kein quantitativer Unterschied zwischen den Wildtyp-Tieren und den BK β 1-Knock-out-Tieren festgestellt werden. Ebenso wird deutlich, dass der Natriumkanal im Nephronabschnitt des CT/CCD durchschnittlich um den Faktor 2,1 stärker exprimiert wurde als im distalen konvoluten Tubulus.

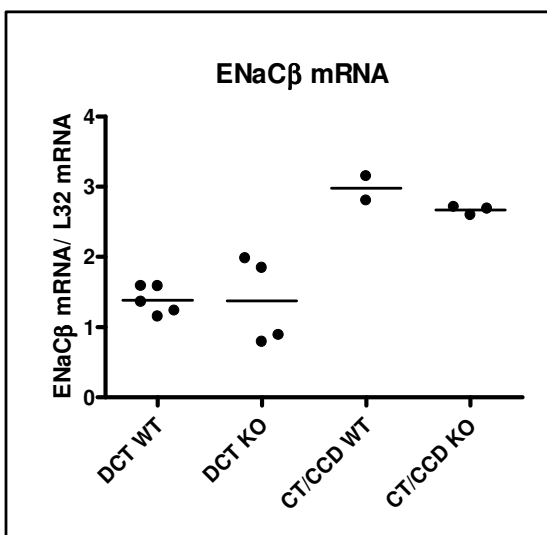


Abb. 13: Stärke der ENaC β mRNA-Expression im DCT und CT/CCD bei Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die L32 mRNA-Menge

(Messdaten und Mittelwert; $n=4-5$ Tiere pro Gruppe, $^*p<0,05$ One-Way-ANOVA)

Im CT/CCD war die ENaC β -Expression um den Faktor 2,1 stärker als im DCT. Im DCT und CT/CCD zeigte sich kein Unterschied zwischen den Tiergruppen.

Das Verhältnis der durchschnittlichen NCC mRNA-Menge zur durchschnittlichen ENaC β mRNA-Menge wird in der Abbildung 14 dargestellt. Im distalen konvolutem Tubulus wiesen die BK β 1-Knock-out-

Mäuse keine signifikant unterschiedliche Expression der NCC mRNA in Relation zu ENaC β RNA als die Wildtyp-Tiere auf.

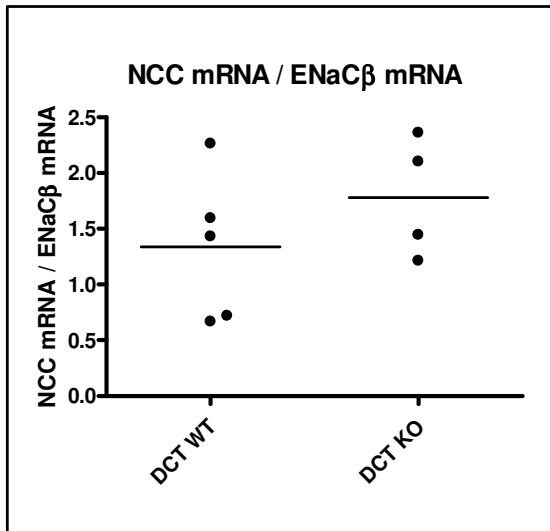


Abb. 14: Stärke der mRNA-Expression von NCC in Relation zu ENaC β im distalen konvoluten Tubulus (DCT) bei Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen (Messdaten und Mittelwert; $n=4-5$ Tiere pro Gruppe, $^*p<0,05$ One-Way-ANOVA) Zwischen den beiden Tiergruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Abbildung 15 beschreibt die KS-WNK1 mRNA Expression. Im DCT konnte aufgrund der starken Streuung der Messdaten von den BK β 1-Knock-out-Tieren keine Aussage bezüglich des Tiergruppenvergleichs getroffen werden. Im CT/CDD-Abschnitt ließ sich bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen keine KS-WNK1 mRNA nachweisen. Bei den Wildtyp-Mäusen konnte eine im Vergleich zum DCT-Abschnitt um ein Sechsfaches verringerte mRNA-Menge an KS-WNK1 gemessen werden.

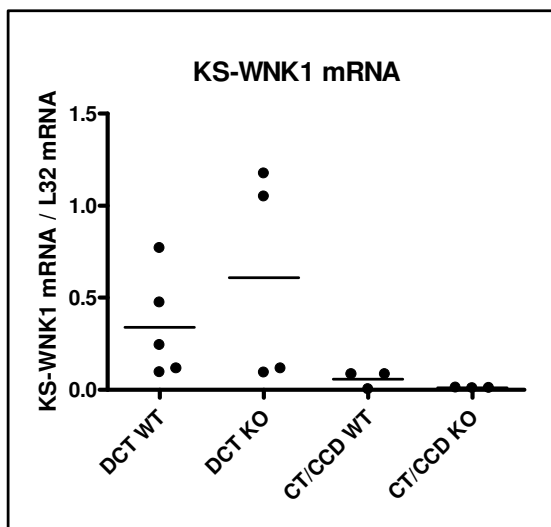


Abb. 15: Stärke der KS-WNK1 mRNA-Expression im DCT und CT/CCD bei Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen (Messdaten und Mittelwert; $n=4-5$ Tiere pro Gruppe, $^*p<0,05$ One-Way-ANOVA) Im DCT war bei den Wildtyp-Tieren die Expression der KS-WNK1 um den Faktor 6 höher als im CT/CCD-Abschnitt; im CT/CCD war keine Expression der KS-WNK1 bei den BK β 1-Knock-out-Tieren nachweisbar. Zwischen den Tiergruppen konnte aufgrund der Messdatenstreuung keine Aussage getroffen werden.

3.2 Ergebnisse der Kaliumdiäten

In diesem Teil der Untersuchungen stand der Einfluss einer veränderten Kaliumzufuhr über die Nahrung und deren Auswirkungen auf die mRNA Expression der Transporter, Kanäle und Kinasen des distalen Nephrons im Mittelpunkt. Dafür wurde den Mäusen über einen Zeitraum von 14 Tagen eine Diät mit einem geringen Kaliumanteil von 0,05% (Tiergruppen 1 und 4) bzw. mit einem hohen Kaliumanteil von 5% (Tiergruppen 3 und 6) verabreicht.

Die in der Real-time PCR gewonnenen Daten wurden hier auf die im Agilent gemessenen RNA-Mengen bezogen. Die errechneten Mittelwerte und Fehler des Mittelwertes (SEM) in den Diagrammen beruhen dabei auf Kortexproben von insgesamt jeweils acht Wildtyp- bzw. BK β 1-Knock-out-Mäusen, die eine kaliumreduzierten Diät erhalten hatten, sowie auf Proben von sieben Wildtyp- und sechs BK β 1-Knock-out-Tieren, die eine kaliumreiche Diät erhalten hatten. Die ermittelten Werte der mRNA-Expressionsraten der im Folgenden beschriebenen Kanäle, Transporter und Enzyme unter einer veränderten Kaliumdiät beziehen sich jeweils auf die Wildtyp- bzw. BK β 1-Knock-out-Mausgruppen, die eine Standardkaliumdiät (0,93%) erhalten hatten und bereits im Kapitel 3.1 beschrieben worden sind.

3.2.1 Der luminale Natriumtransporter NCC und der epitheliale Natriumkanal ENaC β unter Kaliumdiät

Abbildung 16 spiegelt die Veränderung der mRNA-Menge des Natriumchloridcotransporters NCC im Kortex der Mäuse als Reaktion auf die beiden unterschiedlichen Kaliumdiäten wider. Unter kaliumarmer Diät zeigten beide Tiergruppen eine leichte Tendenz, die NCC mRNA-Expression zu reduzieren. Diese tendenzielle, aber nicht signifikante Expressionsabnahme im Vergleich zur Standarddiät betrug durchschnittlich 37% bei den Wildtyp-Tieren und 29% bei den BK β 1-Knock-out-Tieren. Unter kaliumreicher Diät war bei beiden Tiergruppen tendenziell ein leichter Rückgang der NCC mRNA-Expression zu beobachten, wobei die nicht signifikante

durchschnittliche Abnahme bei den Wildtyp-Mäusen 22% und bei den BK β 1-Knock-out-Tieren 24% betrug. Zwischen der 5%-Kaliumdiätgruppe der Wildtyp-Tiere und der 0,05%-Kaliumdiätgruppe der BK β 1-Knock-out-Tiere konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

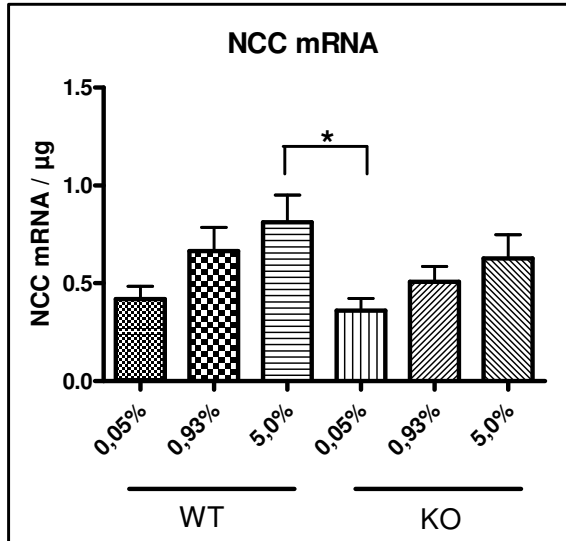


Abb. 16: Stärke der NCC mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät (0,05-5,0%), bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=6-8 Tiere pro Gruppe und Diät, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Die Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäuse verringerten tendenziell leicht die Expression von NCC mRNA bei kaliumarmer Diät nicht signifikant um 37% bzw. 29% und steigerten tendenziell leicht die NCC mRNA Expression bei kaliumreicher Nahrung nicht signifikant um 22% bzw. 24%.

Die Abbildung 17 zeigt die Analyseergebnisse der Real-time PCR in Bezug auf den Natriumtransportkanal ENaC β im Kortex.

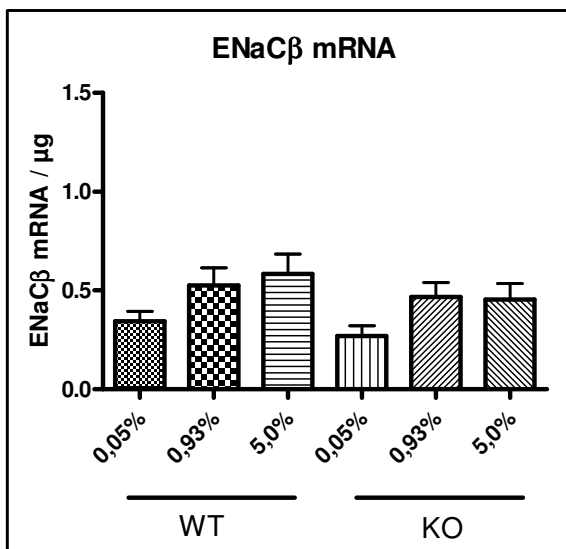


Abb. 17: Stärke der ENaC β mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät (0,05-5,0%), bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=6-8 Tiere pro Gruppe und Diät, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Bei kaliumarmer Diät zeigten beide Tiergruppen eine Tendenz zur Reduzierung der mRNA-Expression (nicht signifikante Abnahme um 35% bei den Wildtyp-Tieren und um 43% bei den BK β 1-Knock-out-Tieren). Nach kaliumreicher Diät zeigten beide Tiergruppen keine Änderung der mRNA-Expression.

Bei niedriger Kaliumdiät zeigten beide Tiergruppen eine Tendenz zur Reduzierung der ENaC β mRNA-Expression. Diese tendenzielle, aber nicht

signifikante Abnahme im Vergleich zum Expressionsniveau bei Kaliumstandarddiät betrug bei den Wildtyp-Mäusen durchschnittlich 35% und bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen 43%. Nach kaliumreicher Diät konnte bei beiden Tiergruppen keine Änderung der ENaC β mRNA-Expression beobachtet werden.

Bei der Betrachtung der Expressionsmenge von NCC in Relation zu ENaC β (Abbildung 18) konnte kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Wildtyp-Diätgruppen festgestellt werden. Bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen war das Verhältnis NCC mRNA zu ENaC β mRNA sowohl nach kaliumarmer als auch nach kaliumreicher Diät tendenziell, aber nicht signifikant größer als nach Standarddiät. Unter kaliumarmer Diät war diese sich andeutende Zunahme (nicht signifikant um 23%) auf eine tendenziell stärkere Abnahme der ENaC β mRNA- (Abbildung 17) als NCC mRNA-Expression (Abbildung 16) zurückzuführen.

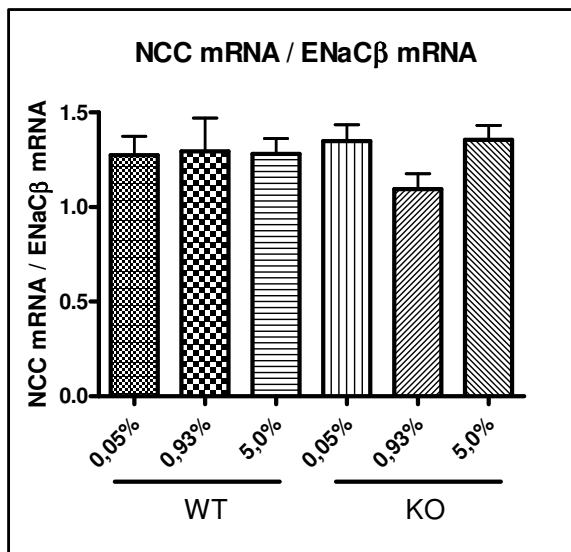


Abb. 18: Stärke der NCC mRNA-Expression in Relation zur ENaC β mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät (0,05-5,0%), bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=6-8 Tiere pro Gruppe und Diät, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Bei den Wildtyp-Tieren war nach den Kaliumdiäten keine Veränderung der NCC mRNA/ENaC mRNA-Relation zu beobachten. Die BK β 1-Knock-out-Tiere in der kaliumarmen Diätgruppe verringerten die Menge der ENaC β mRNA tendenziell, aber nicht signifikant stärker als die Menge an NCC mRNA (um 23%). Nach der kaliumreichen Diät erhöhten die BK β 1-Knock-out-Tiere tendenziell die NCC mRNA-Expression in Relation zu ENaC β mRNA-Expression (nicht signifikant um 24%).

Bei der kaliumreichen Diät beruhte diese sich andeutende Zunahme der Expressionsrelation NCC mRNA zu ENaC β mRNA (nicht signifikant um 24%) auf der tendenziell erhöhten NCC mRNA-Expression (Abbildung 16), während die Menge der ENaC β mRNA auf gleichem Niveau wie unter Standarddiät blieb (Abbildung 17).

3.2.2 Der apikale Kaliumkanal ROMK unter Kaliumdiät

Abbildung 19 stellt die Ergebnisse der Real-time PCR-Analyse des Kaliumkanals ROMK im distalen Nephron bei den unterschiedlichen Diätgruppen dar. Bei den Wildtyp-Mäusen mit kaliumarmer Diät ließ sich im Vergleich zur Standardgruppe eine Tendenz zur Abnahme der Expressionsmenge der ROMK mRNA zu erkennen; die mittlere Abnahme betrug 50%. Aufgrund der großen Streuung der Daten ließ sich keine Signifikanz nachweisen. Nach kaliumreicher Diät zeigten die Wildtyp-Mäuse keine signifikante Veränderung der ROMK mRNA-Expression. Bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen war eine tendenzielle, aber nicht signifikante Abnahme um 50% der ROMK mRNA-Expression bei den Tieren mit kaliumarmer Diät zu erkennen. Nach kaliumreicher Diät veränderten die BK β 1-Knock-out-Tiere ihre ROMK mRNA-Expression nicht.

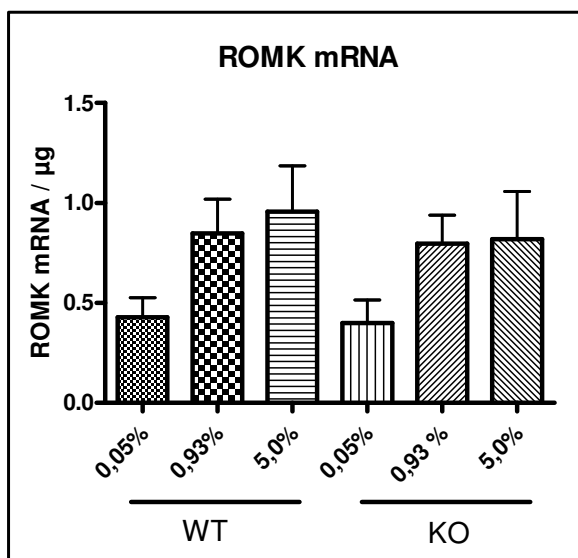


Abb. 19: Stärke der ROMK mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät (0,05-5,0%), bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=6-8 Tiere pro Gruppe und Diät, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Bei kaliumarmer Diät war sowohl bei den Wildtyp- als auch BK β 1-Knock-out-Tieren die Tendenz zu erkennen, ihre ROMK mRNA-Expression zu reduzieren (jeweils nicht signifikant um 50%). Nach kaliumreicher Diät trat bei beiden Tiergruppen keine Veränderung auf.

3.2.3 Die WNK Kinasen unter Kaliumdiät

Wie Abbildung 20 zeigt, wurde die mRNA der kurzen Isoform der WNK1 (KS-WNK1) bei den Wildtyp-Mäusen im Kortex der Tiere mit niedriger Kaliumdiät tendenziell schwächer exprimiert als im Kortex der Tiere unter Standarddiät. Dabei betrug die nicht signifikante Expressionsabnahme durchschnittlich 38%. Bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen war diese Tendenz ebenfalls zu beobachten. Hier betrug die nicht signifikante KS-WNK1 mRNA-Expressionsabnahme 62%. Nach kaliumreicher Diät war weder bei den Wildtyp- noch bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen eine Veränderung der Expression zu beobachten.

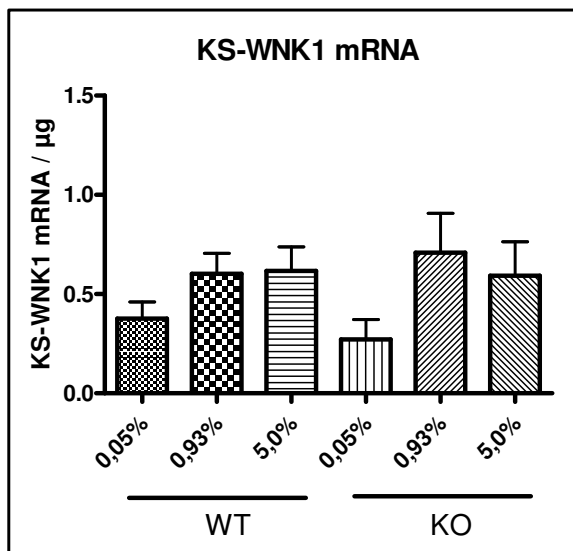


Abb. 20: Stärke der KS-WNK1 mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät (0,05-5,0%), bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=6-8 Tiere pro Gruppe und Diät, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Nach der kaliumreduzierter Diät verringerten beide Tiergruppen tendenziell die KS-WNK1 mRNA-Expression, die Wildtyp-Tiere nicht signifikant um 38%, die BK β 1-Knock-out-Tiere nicht signifikant um 62%. Beide Tiergruppen änderten die KS-WNK1 mRNA-Expression nach kaliumreicher Diät nicht.

Abbildung 21 spiegelt die Veränderung der Expression der langen Isoform WNK1 Kinase (L-WNK1) wider. Bei Wildtyp-Tieren kam es bei der kaliumreduzierten Diät zu einer sich andeutenden, nicht signifikanten Abnahme der quantitativen Expression von L-WNK1 um durchschnittlich 24%. Durch die kaliumreiche Diät konnte keine Veränderung der Expression von L-WNK1 mRNA beobachtet werden. Bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen zeigte sich sowohl durch die kaliumarme als auch kaliumreiche Diät eine Tendenz zur Verringerung der L-WNK1 mRNA-Expression. Die nicht signifikante Abnahme betrug dabei in der 0,05%-Diätgruppe 34% und in der 5,0%-Diätgruppe 21%.

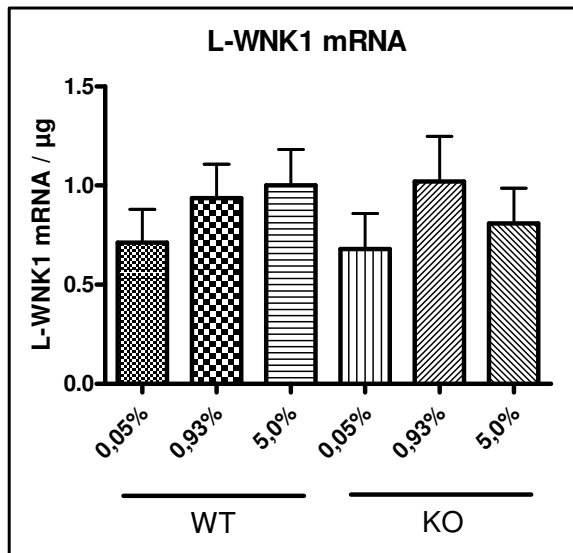


Abb. 21: Stärke der L-WNK1 mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät (0,05-5,0%), bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=6-8 Tiere pro Gruppe und Diät, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Wildtyp-Tiere verringerten bei kaliumarmer Diät tendenziell leicht ihre L-WNK1 mRNA-Expression nicht signifikant um 24%, nach kaliumreicher Diät war keine Veränderung zu beobachten. Die BK β 1-Knock-out-Tiere reduzierten tendenziell sowohl nach kaliumarmer als auch kaliumreicher Diät ihre L-WNK1 mRNA-Expression nicht signifikant um 34% bzw. um 21%.

In Abbildung 22 ist das Verhältnis der mRNA-Expression von KS-WNK1 zu L-WNK1 dargestellt.

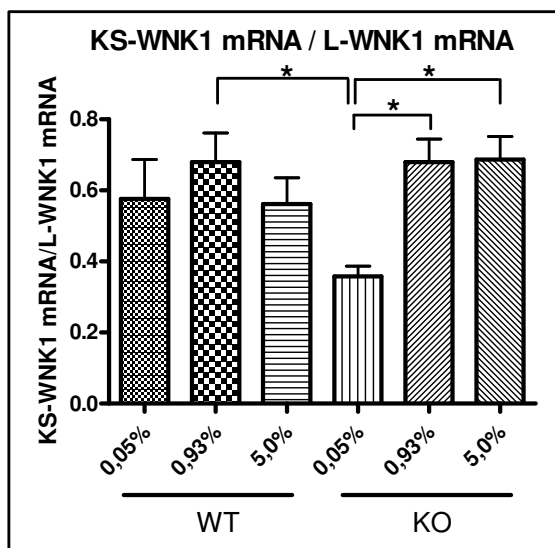


Abb. 22: Stärke der KS-WNK1 mRNA-Expression in Relation zur L-WNK1 mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät (0,05-5,0%), bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=6-8 Tiere pro Gruppe und Diät, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Bei den Wildtyp-Tieren veränderte sich das Verhältnis KS-WNK1/L-WNK1 unter Variation der Kaliumversorgung nicht signifikant. Bei den BK β 1-Knock-out-Tieren war nach kaliumarmer Diät das Verhältnis KS-WNK1/L-WNK1 signifikant zu Gunsten von L-WNK1 verschoben, nach kaliumreicher Diät veränderte sich das Verhältnis der Isoformen nicht.

Bei den Wildtyp-Mäusen verschob sich das Verhältnis von KS-WNK1 zu L-WNK1 im Vergleich zur Standarddiät sowohl durch Verringerung als auch durch Erhöhung der quantitativen Kaliumaufnahme nicht signifikant. Bei den

BK β 1-Knock-out-Tieren war hingegen nach kaliumreduzierter Diät im Vergleich zur Standarddiät und zur kaliumreichen Diät das Verhältnis KS-WNK1/L-WNK1 signifikant um 47% zu Gunsten von L-WNK1 verschoben. Bei den BK β 1-Knock-out-Tieren war nach kaliumreicher Diät keine Veränderung des Verhältnisses der WNK1-Isoformen im Vergleich zur Standarddiät zu beobachten.

Die Ergebnisse der Real-time PCR-Analyse für die WNK Kinase 4 mRNA sind in Abbildung 23 dargestellt. Es deutet sich an, dass die Wildtyp-Mäuse bei Kaliumreduktion die Expression von WNK4 verringerten (nicht signifikante Abnahme um 38%). Diese Tendenz ließ sich auch bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen nach kaliumarmer Diät erkennen (nicht signifikante Abnahme um 35%). Nach kaliumreicher Diät kam es sowohl bei den Wildtyp- als auch BK β 1-Knock-out-Mäusen zu keiner Veränderung der WNK4 mRNA-Expression.

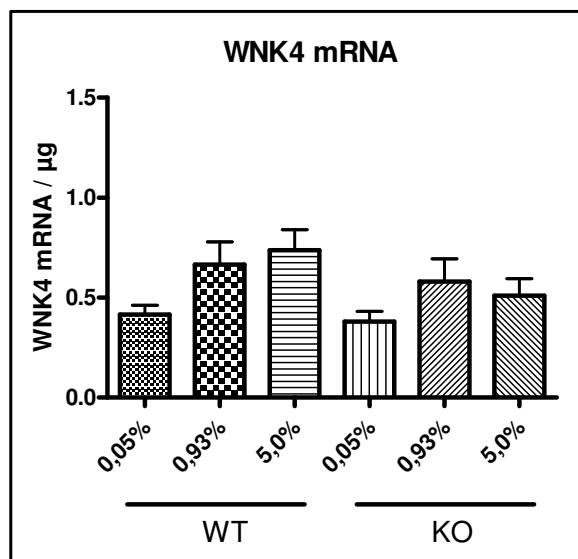


Abb. 23: Stärke der WNK4 mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät (0,05-5,0%), bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=6-8 Tiere pro Gruppe und Diät, *;p<0,05 One-Way-ANOVA)

Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Tieren reduzierten tendenziell ihre WNK4 mRNA-Expression nach kaliumarmer Diät (nicht signifikant um 38% bzw. 35%). Nach kaliumreicher Diät zeigten beide Tiergruppen keine Veränderung der mRNA-Expression.

3.2.4 Die SGK1 Kinase und das Protein GRP58 unter Kaliumdiät

In Hinblick auf die SGK1 ergab sich aus der Real-time PCR-Analyse (Abbildung 24), dass die SGK1 mRNA-Expression bei den Wildtyp-Mäusen nach verminderter Kaliumzufuhr tendenziell abnahm (nicht signifikante Verringerung um 40%). Nach der kaliumreichen Diät blieb die mRNA Expressionsstärke konstant.

Wie ebenfalls zu erkennen ist, verursachte die kaliumarme Nahrung bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen ebenfalls eine tendenzielle, aber nicht signifikante Reduktion der Expression der SGK1 mRNA um durchschnittlich 47%. Die Erhöhung der Kaliumkonzentration im Futter auf 5% führte zu keiner Änderung der mRNA-Expression.

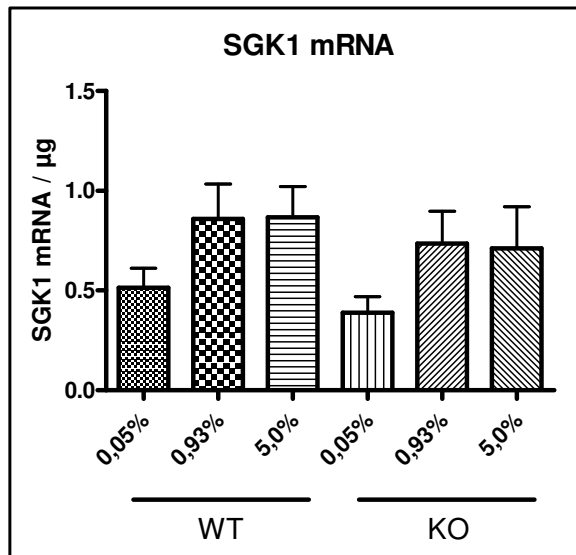


Abb. 24: Stärke der SGK1 mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät (0,05-5,0%), bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=6-8 Tiere pro Gruppe und Diät, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Nach kaliumarmer Diät wurde die SGK1 mRNA-Expression sowohl von den Wildtyp- als auch von den BK β 1-Knock-out-Tieren tendenziell, aber nicht signifikant reduziert (um 40% bzw. 47%). Unter der kaliumreichen Diät kam es zu keiner Änderung des Expressionslevels bei Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Tieren.

Abbildung 25 zeigt die quantitative Analyse des Faktors GRP58.

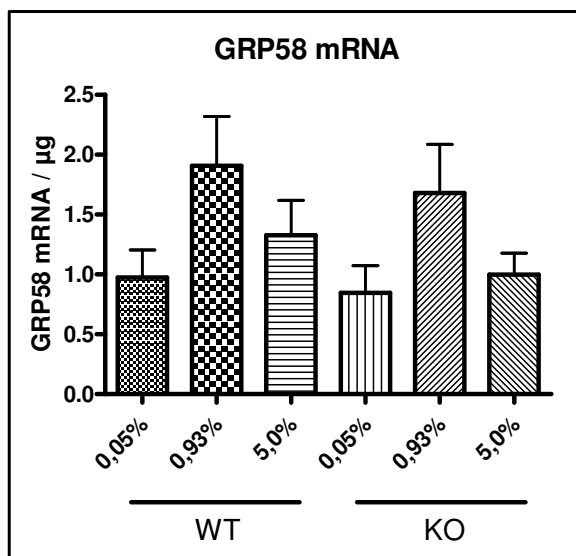


Abb. 25: Stärke der GRP58 mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät (0,05-5,0%), bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=6-8 Tiere pro Gruppe und Diät, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Wildtyp-Tiere reduzierten tendenziell die GRP58 mRNA-Expression nach Verabreichung kaliumarmer und kaliumreicher Nahrung nicht signifikant um 49% bzw. 30%. Die BK β 1-Knock-out-Tiere verringerten ebenfalls die mRNA-Expression nach 0,05%- und 5,0%-Kost tendenziell, aber nicht signifikant um 50% bzw. 41%.

Die Wildtyp-Mäuse der Tiergruppen mit kaliumarmer bzw. kaliumreicher Diät reduzierten im Vergleich zu den Mäusen unter Standarddiät tendenziell die GRP58 mRNA-Expression um 49% bzw. um 30%. Aufgrund der Streuung der Daten konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden. Bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen deutete sich sowohl nach kaliumarmer als auch kaliumreicher Diät eine Tendenz zur Verringerung der Expressionsraten von GRP58 mRNA im Kortex an. Diese nicht signifikante Abnahme betrug durchschnittlich 50% bzw. 41%.

3.2.5 Das Protein CHIF unter Kaliumdiät

Bei der Untersuchung des Faktors CHIF (Abbildung 26) war zu beobachten, dass die Wildtyp-Tiere ihre mRNA-Expression bei Verabreichung kaliumveränderter Nahrung tendenziell leicht verringerten. In der Gruppe der 0,05%-Kaliumdiät kam es durchschnittlich zu einer nicht signifikanten Abnahme um 29% und in der 5%-Kalium-Gruppe um 25%. Bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen war diese Tendenz ebenfalls zu beobachten; hier war die Expressionsabnahme von CHIF etwas deutlicher. Im Durchschnitt reduzierten die BK β 1-Knock-out-Tiere die mRNA-Expression bei der 0,05%-Kaliumdiät um 44% und bei der 5%-Kalium-Diät um 43% (keine Signifikanz nachweisbar).

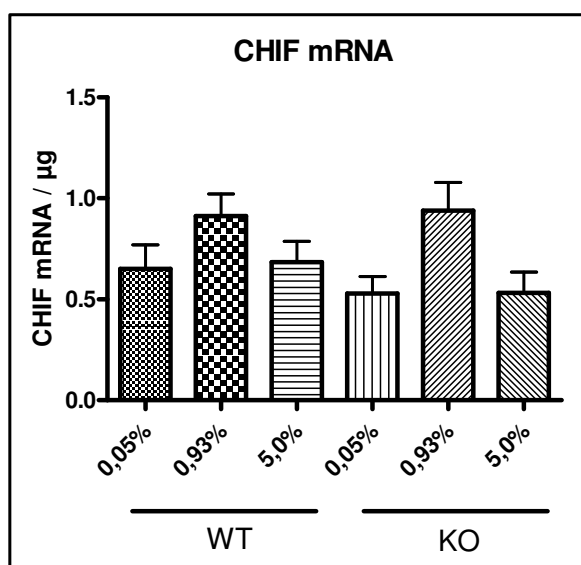


Abb. 26: Stärke der CHIF mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät (0,05-5,0%), bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=6-8 Tiere pro Gruppe und Diät, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Bei den Wildtyp-Mäusen deutete sich eine leichte Abnahme der CHIF mRNA-Expression an (bei kaliumarmer Diät nicht signifikant um 29% und bei kaliumreicher Diät um 25%). Die BK β 1-Knock-out-Tiere verringerten ebenfalls die mRNA-Expression tendenziell, aber nicht signifikant (um 44% nach kaliumarmer Diät und um 43% nach kaliumreicher Diät).

3.2.6 Der Transporter NKCC2 unter Kaliumdiät

Abbildung 27 fasst die gewonnenen Resultate der Real-time PCR-Analyse in Bezug auf die quantitative Veränderung der mRNA-Expression des Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporters (NKCC2) unter Kaliumdiät zusammen. Dabei wurde die NKCC2 mRNA von den Wildtyp-Mäusen mit kaliumarmer Diät tendenziell geringer exprimiert als bei der zugehörigen Kalium-Standarddiätgruppe. Im Durchschnitt reduzierte sich die mRNA-Expression nicht signifikant um 51%. Diese Tendenz war ebenfalls bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen zu beobachten; hier betrug die nicht signifikante Abnahme der NKCC2 mRNA-Expression 57%. Nach kaliumreicher Diät war keine Expressionsveränderung der NKCC2 mRNA sowohl bei den Wildtyp- als auch BK β 1-Knock-out-Mäusen zu beobachten.

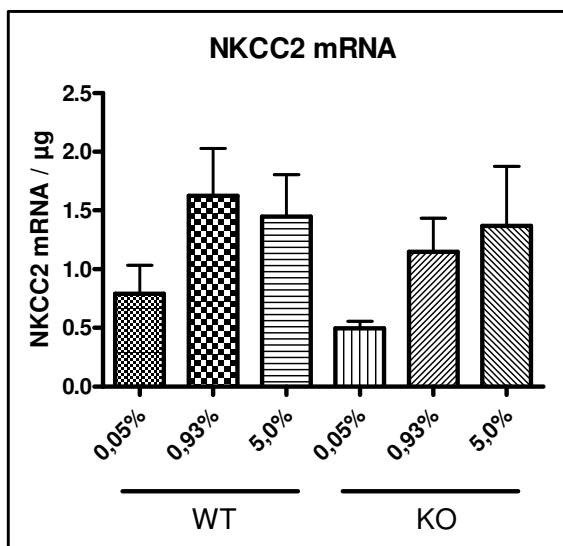


Abb. 27: Stärke der NKCC2 mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät (0,05-5,0%), bezogen auf die RNA-Menge

(Mittelwert+SEM; n=6-8 Tiere pro Gruppe und Diät, *:p<0,05 One-Way-ANOVA)

Die NKCC2 mRNA-Expression nahm nach kaliumarmer Diät bei den Wildtyp-Tieren tendenziell, aber nicht signifikant um 51% ab. Bei den BK β 1-Knock-out-Tieren betrug die nicht signifikante Expressionsabnahme 57%. Beide Tiergruppen veränderten ihre Expression nach kaliumreicher Diät nicht.

4. Diskussion

4.1 Motivation der Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Frage, welche Rolle die WNK Kinasen bei der Steuerung der natriumabhängigen Kaliumsekretion übernehmen. Eine Vielzahl von bislang durchgeführten in-vitro Untersuchungen mit *Xenopus laevis* Oozyten zeigten bereits, dass die WNK Kinasen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Ionenkanäle und Ionentransporter des distalen Nephrons spielen (Wade et al. 2006). Dabei besteht die besondere Bedeutung der WNK Kinasen in der Vermittlung des Switches zwischen einer elektroneutralen Natriumresorption im distalen Konvolut und einer elektrogenen Natriumresorption im Sammelrohr. Somit soll die Aktivität der WNK Kinasen die Natriumresorption mit oder ohne Kaliumsekretion beeinflussen. In der Literatur wurden bislang nur wenige in-vivo Versuche mit Ratten bzw. Mäusen beschrieben, in denen die Rolle der WNK Kinasen bei der Regulation des Elektrolyttransportes im distalen Nephron unter Kaliumdiät untersucht wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die mRNA-Expression der am Elektrolyttransport beteiligten Transporter und Kinasen im distalen Nephron der Niere mit Wildtyp C57bl6- und BK β 1-Knock-out-Mäusen untersucht. Zusätzlich zu der Gabe von verschiedenen Kaliumdiäten, die schon Bestandteil einiger der oben erwähnten Studien waren, wurden hier BK β 1-Knock-out-Mäuse, die einen chronisch erhöhten Aldosteronplasmaspiegel und eine Hypokaliämie aufweisen, miteinbezogen. Dadurch sollte die diskutierte Rolle der WNK Kinasen als modulierender Weg der Elektrolytresorption im distalen Nephron auch unter chronisch erhöhtem Aldosteronspiegel untersucht werden.

4.2 Wildtyp-Mäuse unter Kaliumdiät

Im ersten Abschnitt der Diskussion stand die Frage, wie sich die quantitative Genexpression der Kanäle und WNK Kinasen bei unterschiedlicher Kaliumaufnahme verändert, im Mittelpunkt.

Das bislang verwendete Modell der Elektrolytresorption im distalen Nephron liefert nur unzureichende Erklärungsmöglichkeiten für unterschiedliche physiologische Situationen. So bewirkt die Abnahme des extrazellulären Volumens über das Renin-Angiotensin-II-System eine erhöhte Freisetzung von Aldosteron. Als Folge führt eine gesteigerte Natriumresorption über eine gesteigerte Expression des Natriumtransporters ENaC im Sammelrohr zu einem geregelten Blutdruckanstieg. Dieser Mechanismus würde jedoch gleichzeitig aufgrund der erhöhten elektrochemischen Antriebskraft zu einer gesteigerten Kaliumsekretion führen. Desweiteren stimuliert neben einer Hypovolemie z.B. auch eine Hyperkaliämie die Freisetzung von Aldosteron. Im Gegensatz zur ersten Situation wird hier aber eine vermehrte Kaliumsekretion ohne erhöhte Natriumresorption angestrebt. Eine von der Natriumresorption unabhängige Regulation der Kaliumsekretion ist somit für die Aufrechterhaltung der Homöostase bei unterschiedlichen physiologischen Situationen wichtig (McCormick et al. 2008). Ein möglicher Ansatzpunkt für diese Entkopplung der beiden Resorptionswege stellt der sogenannte „WNK-Pathway“ dar. So wurde in der Literatur beschrieben, dass die WNK Kinasen neben der SGK1 Kinase ein weiteres, ergänzendes Steuersystem im distalen Nephron darstellen (O'Reilly et al. 2006). Im neu diskutierten Modell der Elektrolytresorption soll der WNK-Pathway dafür sorgen, dass bei einem aufgrund einer Hypovolemie erhöhten Aldosteronspiegel die Natriumresorption ohne Kaliumsekretion erfolgt. Dies soll durch die WNK-vermittelte selektive Aktivierung der Natriumtransporter NCC erreicht werden. Andererseits wird ein durch Hyperkaliämie bedingter Aldosteronanstieg von einer vermehrten Kaliumsekretion gefolgt, ohne dass die Natriumresorption beeinflusst wird. Im Falle der Hyperkaliämie soll Aldosteron über die Aktivierung der KS-WNK1 einen Shift von der elektroneutralen Natriumresorption via NCC zugunsten der elektrogenen Natriumresorption via

ENaC induzieren und somit die Kaliumsekretion über den ROMK-Kanal erhöhen (Wade et al. 2006, McCormick et al. 2008).

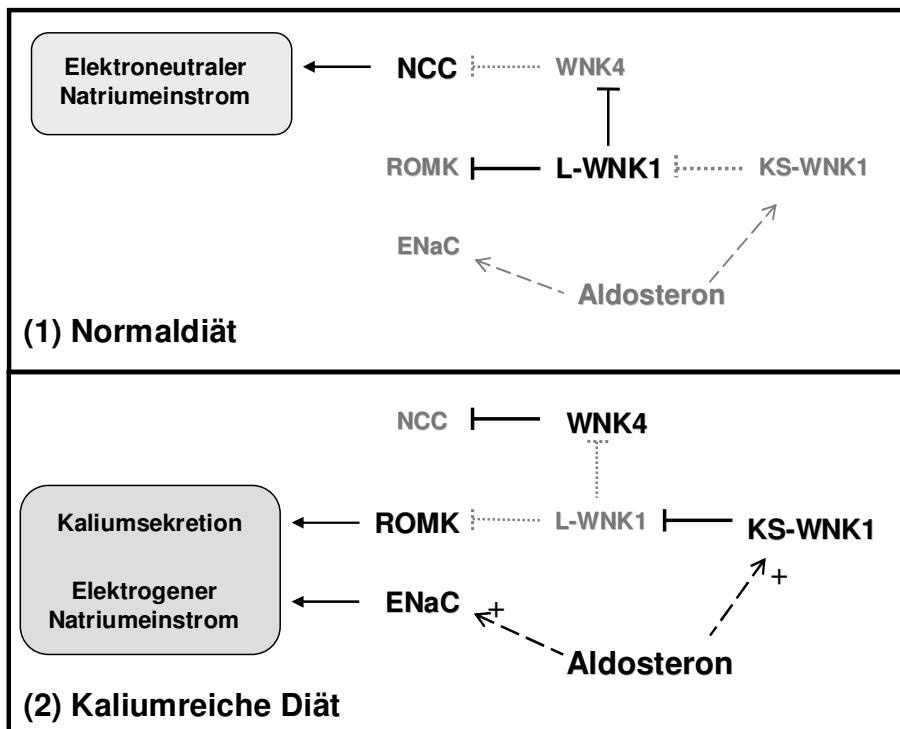


Abb. 28: Regulationsschema der WNK Kinasen und luminalen Transporter bei Normaldiät und bei kaliumreicher Diät:

(1) Normaldiät: Die Expression der langen Isoform L-WNK1 überwiegt, so dass die WNK4 gehemmt wird. Damit wird deren Hemmung auf den Natriumtransporter NCC aufgehoben, so dass der elektroneutrale Natriumtransport dem elektrogenen über den Natriumkanal ENaC vorgezogen wird. Der Antrieb für die Kaliumsekretion durch den Kaliumkanal ROMK ist somit niedrig. Gleichzeitig hemmt die L-WNK1 den ROMK-Kanal.

(2) Kaliumreiche Diät: Im Fall einer erhöhten Kaliumdiät kommt es zu einem Anstieg von Aldosteron und damit zu einer erhöhten Expression der kurzen Isoform der WNK1 (KS-WNK1). Diese hemmt die lange Isoform der WNK1 (L-WNK1) und hebt damit die Hemmung des Kaliumkanals ROMK auf, so dass es zu einer erhöhten Kaliumsekretion kommen kann. Ebenfalls wird die Hemmung der WNK4 durch L-WNK1 aufgehoben, so dass der Natriumtransporter NCC blockiert wird. Durch den Aldosteronanstieg, hervorgerufen durch die Hyperkaliämie, wird der Natriumkanal ENaC verstärkt aktiviert. Es erfolgt die Depolarisation der Membran und die Kaliumsekretion via ROMK wird gefördert. Es kommt zum Shift von der elektroneutralen zur elektrogenen Natriumresorption. In der Folge bleibt die renale Gesamt-Natriumresorption unabhängig von der erhöhten Kaliumsekretion (Wade et al. 2006).

Regulation des Elektrolyttransports im distalen Nephron durch WNK Kinasen bei Kaliumdiät

In der Literatur wurde das folgende mögliche Zusammenspiel des Aldosterons mit den WNK Kinasen diskutiert (vgl. Abb. 28): Bei einem durch Hyperkaliämie ausgelösten Anstieg des Aldosteronspiegels verschiebt sich das Verhältnis von KS-WNK1 zu L-WNK1 zugunsten der kurzen Isoform. Da

die KS-WNK1 die lange Splicevariante der WNK Kinase 1 (L-WNK1) hemmt, wird deren inhibitorische Wirkung auf die Aktivität des Kaliumkanals ROMK aufgehoben (Lazrak et al. 2006). Damit kann es zu einer gesteigerten Kaliumsekretion durch den Kaliumkanal ROMK kommen. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die WNK4 die Aktivität des Natriumtransporter NCC über eine Reduzierung der Kanalexpression an der Zelloberfläche hemmt (Golbang et al. 2006). Da angenommen wird, dass WNK4 wiederum durch L-WNK1 inhibiert wird, würde eine Steigerung der KS-WNK1-Aktivität die WNK4-Hemmung durch L-WNK1 aufheben. Damit würde indirekt eine Hemmung der Natriumresorption via NCC im distalen Nephron resultieren (Subramanya et al. 2006b). Die Aktivität des Natriumkanals ENaC kann möglicherweise direkt durch Aldosteron über SGK1 gesteigert werden (Wade et al. 2006, Huang und Kuo 2007) und des Weiteren reguliert KS-WNK1 den Natriumtransporter ENaC über die Serum-Glucocorticoid-Kinase SGK 1 (Xu et al. 2005b; Naray-Fejes-Toth et al. 2004). Dahingegen hemmt WNK4 die Aktivität des Natriumtransporters ENaC über die Clathrin-vermittelte Endozytose (Ring et al. 2007a). Diese Hemmung des ENaC durch WNK4 wird jedoch bei hohem Aldosteronspiegel durch die Aktivität der SGK1 aufgehoben (Ring et al. 2007b).

Bei Abnahme des Aldosteronspiegels verschiebt sich das Verhältnis von KS-WNK1 zu L-WNK1 wiederum zugunsten von L-WNK1 (Huang und Kuo 2007). Infolgedessen werden der ROMK-Kanal und damit auch die Kaliumsekretion gehemmt. Wade et al. (2006) postulierten daher, dass das Verhältnis von KS-WNK1 zu L-WNK1 als zentrales Steuerungselement der Kaliumhomöostase fungiert. Über eine Veränderung des KS-WNK1/L-WNK-1 Verhältnisses kann, wie oben beschrieben, eine Verschiebung der Natriumresorption von der elektroneutralen über NCC zur elektrogenen über ENaC erreicht werden. Dies würde eine unveränderte Natriumresorption ermöglichen, jedoch eine starke Veränderung der Kaliumsekretion mit sich bringen.

Mit den durchgeführten Experimenten sollte geklärt werden, ob sich bei den Wildtyp-Mäusen unter erhöhter Kaliumdiät, und damit einem erhöhten Aldosteronplasmaspiegel, die quantitativen Verhältnisse der WNK Kinasen untereinander verändern und in der Folge auch der vermutete Shift der Natriumresorption vom elektroneutralen Natriumtransporter NCC zum

elektrogenen Natriumkanal ENaC auf mRNA Ebene zu beobachten ist. Des Weiteren wurden die Folgen der kaliumreduzierten Diät untersucht.

4.2.1 Der Natrium-Chlorid-Cotransporter (NCC)

Bei der Analyse des NCC-Transporters, der für die elektroneutrale Resorption des gefilterten Natriums im DCT verantwortlich ist, zeigten die Wildtyp-Mäuse unter kaliumarmer Diät eine Tendenz zur Verringerung der NCC mRNA-Expression (nicht signifikant um 37%). Diese sich hier andeutende NCC-Abnahme stimmt mit den Ergebnissen von Elkjaer et al. (2002) überein, die in ihrer Studie mit hypokaliämischen Ratten eine signifikante Reduktion der NCC mRNA-Expression feststellten. Frindt und Palmer (2010) berichteten ebenfalls von einer Abnahme der NCC Proteinexpression nach kaliumarmer Diät bei Ratten; die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant. Als Reaktion auf die kaliumreiche Diät ließ sich hier bei Wildtyp-Mäusen nur eine leichte, nicht signifikante Steigerung der NCC mRNA-Expression um 22% beobachten. Frindt und Palmer (2010) hatten in einer Studie mit Ratten nach kaliumreicher Diät (10% KCl) eine signifikante Abnahme der NCC-Proteinexpression an der Zelloberfläche beobachten können. Möglicherweise lassen sich signifikante Änderungen des NCC-Transporters nicht auf der mRNA-Ebene sondern nur auf der Aktivitätsebene des Transporters bzw. dessen Proteinmenge in der Plasmamembran beobachten. So zeigten neuere Studien beispielsweise, dass einerseits WNK4 sowohl die Menge des NCC-Transporters an der Zelloberfläche durch Blockierung des Transports zur apikalen Membran reduzieren kann, andererseits WNK4 im phosphorylierten Zustand, über SPAK (Ste20-related proline-alanine-rich kinase) vermittelt, die Aktivität des NCC-Transporters durch Phosphorylierung erhöhen kann (Welling et al. 2010).

4.2.2 Der epitheliale Natriumkanal (ENaC)

Die kaliumarme Diät bewirkte bei den Wildtyp-Mäusen eine tendenzielle, nicht signifikante Abnahme der mRNA-Expression des Natriumkanals ENaC um 35%. Diese Beobachtung wird von den signifikanten Ergebnissen in den

Studien von Elkjaer et al. (2002) und Frindt und Palmer (2010) bestätigt. Mit der Reduktion der ENaC-Kanäle könnte der Aufbau eines elektrochemischen Gradienten für die Kaliumsekretion über den ROMK-Kanal vermieden werden. Durch die kaliumreiche Diät wurde hier bei den Wildtyp-Mäusen keine Änderung der ENaC mRNA-Expression hervorgerufen. Frindt und Palmer (2010) konnten eine erhöhte ENaC Proteinexpression an der Zelloberfläche bei Ratten nach kaliumreicher Diät nachweisen. Diese Beobachtung unterstützte die bereits oben erwähnte Theorie des NCC-ENaC-Shifts (O'Reilly et al. 2006).

Das Verhältnis der mRNA-Expression von NCC zu ENaC wurde in den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen durch kaliumarme bzw. kaliumreiche Diät im Gegensatz zu den BK β 1-Knock-out-Mäusen (vgl. Kap. 4.4.1) bei den Wildtyp-Mäusen nicht verändert. Der in der Literatur beschriebene Shift der Natriumresorption vom elektroneutralen NCC-Kanal im distalen Tubulus zum elektrochemischen ENaC-Kanal im Sammelrohr (Wade et al. 2006) bei kaliumreicher Diät konnte hier mit den Ergebnissen auf der mRNA-Expressionsebene nicht bestätigt werden. Dies deutet darauf hin, dass der vermutete Shift sich möglicherweise vor allem auf der Ebene der veränderten Aktivitätszustände der Transporter, der Abundanz in der apikalen Membran oder der Proteinexpression abspielt.

4.2.3 Der luminale Kaliumkanal ROMK

Unter kaliumarmer Diät zeigten die Untersuchungsergebnisse bei den Wildtyp-Mäusen eine nicht signifikante Abnahme der mRNA-Expression des Kaliumkanals ROMK um 50%. In der Studie von Wald et al. (1998) wurde diese Reduktion der mRNA-Expression ebenfalls beobachtet. Mennit et al. (2000) sowie Frindt und Palmer (2010) berichteten über eine signifikante Abnahme der ROMK-Proteinexpression nach kaliumarmer Diät. Durch die Reduktion des Kaliumkanals könnten die Tiere einen weiteren Kaliumverlust vermeiden.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen unter kaliumreicher Diät zeigten die Tiere keine signifikante Änderung der ROMK mRNA-Expression. Über das Verhalten des ROMK-Kanals unter kaliumreicher Kost lassen sich in der

Literatur unterschiedliche Ergebnisse finden. In der Arbeit von Lalioti et al. (2006) wurde ein Anstieg der ROMK mRNA-Expression beschrieben, während Frindt et al. (1998) berichteten, dass nach hoher Kaliumdiät bei Ratten keine Steigerung der ROMK-Transkription hervorgerufen wurde. Da die Wildtyp-Mäuse in der vorliegenden Arbeit auf die vermehrte Kaliumzufuhr nicht mit einer Änderung der mRNA-Expression der ROMK-Kanäle reagierten, erfolgte die Steigerung der Kaliumsekretion möglicherweise über die Änderung der Aktivität, Abundanz in der Membran oder Proteinexpression des ROMK. So wurde im kortikalen Sammelrohr von Ratten keine Änderung der ROMK mRNA-Expression gefunden (Frindt et al. 1998), jedoch ein signifikanter Anstieg der ROMK Proteinexpression an der Zelloberfläche nach kaliumreicher Diät (Frindt und Palmer 2010).

Ein weiterer Aspekt war die Frage, ob bei den Wildtyp-Tieren unter kaliumreicher Diät für die Kaliumsekretion neben den ROMK-Kanälen andere Transporter aktiviert würden. BK-Kanäle werden in erster Linie für die Kaliumsekretion unter erhöhtem Fluss verantwortlich gemacht (Woda et al. 2001) und sind bei Wildtyp-Mäusen nur bei hoch dosierter Kaliumdiät nachweisbar (Rieg et al. 2007). Grimm et al. (2007) konnten nachweisen, dass bei kaliumreicher Diät bei Wildtyp-Tieren sowohl die BK α -Expression als auch die ROMK-Expression im Sammelrohr steigt. So wird diskutiert, dass der Kaliumkanal ROMK und der BK-Kanal bei chronisch erhöhter Kaliumgabe dann gemeinsam zur vermehrten Kaliumsekretion beitragen (Samsom und Welling 2007). Rieg et al. (2007) berichteten in ihrer Studie, dass nach sechs Tagen unter hoher Kaliumdiät eine messbare Expression von BK α -Untereinheit in Wildtyp-Mäusen induziert wurde. Eine verglichen mit der Kontrolldiät signifikant höhere renale ROMK Proteinexpression konnte im Gegensatz zu den Studien von Grimm et al. (2007) und Samsom und Welling (2007) jedoch nur bei BK α -Knock-out-Mäusen beobachtet werden, nicht jedoch bei den Wildtyp-Tieren (Rieg et al. 2007). Möglicherweise kompensierten also die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Wildtyp-Mäuse die vermehrte Kaliumzufuhr mit einer erhöhten Expression bzw. Aktivierung von BK-Kanälen, ohne die ROMK mRNA-Expression zu erhöhen. Rieg et al. (2007) erläuterten in ihrer Studie ebenfalls, dass sich die Kaliumplasmakonzentrationen bei kaliumreicher Diät von Wildtyp- und BK α -

Knock-out-Mäusen trotz erhöhtem Aldosteronplasmaspiegel bei den Knock-out-Tieren nicht unterschieden. Sie vermuteten deshalb, dass hier ein unidentifizierter „kaliuretic factor“ eine Rolle spielen müsste und nannten die WNK Kinasen als mögliche Kandidaten, die für den ROMK-Anstieg bei den BK α -Knock-out-Tieren und somit für ein konstantes Kaliumplasma sorgten (Rieg et al. 2007).

4.2.4 Verhalten der Kinasen

Die kurze Isoform der WNK Kinase 1 (KS-WNK1)

Die Analyse der KS-WNK1 mRNA-Expression bei den Wildtyp-Mäusen ergab bei kaliumreduzierter Diät eine im Vergleich zur Standarddiätgruppe nicht signifikante Abnahme der mRNA-Expression um 38%. Diese hier beobachtete Tendenz zur Expressionsreduktion findet sich auch als signifikanter Zusammenhang in der Studie von Lazrak et al. (2006), in denen Ratten mit hoher (4,95%) und normaler (0,67%) Kaliumdiät sowie kaliumfreier Nahrung versorgt wurden und mit Hilfe der Real-time PCR eine Abnahme der KS-WNK1 mRNA-Expression unter niedriger Kaliumdiät nachgewiesen wurde. O'Reilly et al. (2006) beobachteten ebenfalls eine signifikante Reduktion der KS-WNK1 mRNA-Expression nach kaliumarmer Diät bei Mäusen. Im Gegensatz hierzu stehen die Studienergebnisse von Wade et al. (2006), die Sprague-Dawley-Ratten für zwei Tage mit Futter ohne Kalium und mit Futter mit 10% KCl aussetzten. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wiesen die Ratten der kaliumfreien Diät keine quantitative Veränderung der KS-WNK1 mRNA-Expression auf. Durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Abnahmetendenz der KS-WNK1 mRNA-Expression bei geringer Kaliumzufuhr könnten die Wildtyp-Mäuse die Hemmung der L-WNK1 durch KS-WNK1 reduzieren, so dass die durch L-WNK1 vermittelte Hemmung des Kaliumkanals ROMK stärker zur Geltung käme und eine weitere Kaliumsekretion verhindert würde. Gleichzeitig könnte durch die vermehrte Aktivität der L-WNK1 die Hemmung der WNK4 gefördert und damit die WNK4 vermittelte Hemmung auf den Natriumkanal NCC aufgehoben werden (vgl. Abb. 30). Die Wildtyp-Mäuse könnten somit die elektrogene Natriumaufnahme

durch den NCC-Kanal fördern, ohne eine weitere Kaliumsekretion zu provozieren.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Lazrak et al. (2006), Wade et al. (2006) und O'Reilly et al. (2006) zeigte sich in den hier durchgeführten Untersuchungen bei den Wildtyp-Mäusen unter kaliumreicher Diät keine Erhöhung der KS-WNK mRNA-Expression.

Die lange Isoform der WNK Kinase 1 (L-WNK1) und das Verhältnis der Isoformen zueinander

Die Wildtyp-Mäuse verringerten tendenziell leicht ihre L-WNK1 mRNA-Expression bei kaliumreduzierter Diät (nicht signifikant um 24%). Wade et al. (2006) hatten bei Ratten nach kaliumfreier Diät keine Änderung der L-WNK1-Expression beobachtet. Im Gegensatz hierzu berichteten Lazrak et al. (2006) von einem Anstieg der L-WNK1 mRNA-Expression bei kaliumarmer Diät. In den vorliegenden Untersuchungen veränderten die Wildtyp-Mäuse unter kaliumreicher Nahrung ihre L-WNK1 mRNA-Expression nicht. Auch in den Studien von Lazrak et al. (2006) und Wade et al. (2006) waren keine signifikanten Änderungen der L-WNK1 mRNA-Expression beobachtet worden. Eventuell erfolgte die Änderung der L-WNK1 nur auf der Ebene der Aktivität.

In der Literatur wird die Veränderung des Verhältnisses von KS-WNK1 zu L-WNK1 als mögliche zentrale Steuerungsmöglichkeit des Kaliumtransports im distalen Nephron diskutiert (Wade et al. 2006). Bei kaliumarmer Diät war das Verhältnis KS-WNK1/L-WNK1 in den hier durchgeführten Untersuchungen bei den Wildtyp-Mäusen nicht verändert. Wade et al. (2006) konnten ebenfalls keinen Effekt nach kaliumfreier Diät beobachten. Die Bedeutung des KS-WNK1/L-WNK1-Verhältnisses auf die Kaliumsekretion wird aus Liu et al. (2009) deutlich. Transgene Mäuse, die die KS-WNK1 überexprimierten, wiesen dort bei höherer fraktionierter Kaliumsekretion einen niedrigeren Kaliumplasmaspiegel auf. Bei diesen transgenen Mäusen wurde in der apikalen Membran des distalen Nephrons eine größere Menge an ROMK nachgewiesen. Liu et al. (2009) folgerten daraus, dass KS-WNK1

aufgrund ihres indirekten Effekts auf ROMK einen wichtigen physiologischen Regulator der renalen Kaliumsekretion darstellt.

Eine Veränderung des Expressionsverhältnisses der Isoformen KS-WNK1 und L-WNK1 zueinander konnte auch nach kaliumreicher Diät in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht beobachtet werden. Wie bereits oben erwähnt, liegt die Vermutung nahe, dass es bei den Wildtyp-Mäusen nur zu einer Veränderung auf dem Niveau der Aktivität der Kinasen kommt. Wade et al. (2006) hatten in ihrer Studie mit Ratten hingegen eine verstärkte mRNA-Expression zugunsten der KS-WNK1 beobachtet. Damit könnte die erhöhte KS-WNK1 im distalen Nephron den inhibitorischen Effekt von L-WNK1 auf die Kaliumkanäle ROMK nach kaliumreicher Diät aufheben. Folglich könnte es zu einer vermehrten Kaliumsekretion durch den ROMK-Kanal kommen (Wade et al. 2006).

Die WNK Kinase 4 (WNK4)

Nach kaliumarmer Diät zeigten die Wildtyp-Mäuse die Tendenz, ihre mRNA-Expression der WNK Kinase 4 zu reduzieren (nicht signifikante Abnahme um 38%). O`Reilly et al. (2006) hatten nach Hypokaliämie keine Änderung der WNK4 mRNA-Expression beobachten können. Nach kaliumreicher Diät veränderten die Wildtyp-Mäuse im Rahmen der vorliegenden Arbeit ihre WNK4 mRNA-Expression nicht signifikant. O`Reilly et al. (2006) beschrieben in ihrer Studie dagegen einen signifikanten Anstieg der WNK4 mRNA-Expression.

Aus den hier durchgeführten Untersuchungen deutet sich ein Switch zwischen elektrogener und elektroneutraler Natriumresorption durch die WNK4 an. Der unter kaliumarmer Diät beobachtete nicht signifikante Rückgang der mRNA-Expression der WNK4 und die damit zu erwartende verbundene geringere Hemmung des NCC-Transporters würden zu einer erhöhten elektroneutralen Natriumresorption im DCT führen. Durch das geringere Natriumangebot im distalen Nephron würde der Aufbau des elektrochemischen Gradienten für die Kaliumsekretion durch den Kaliumkanal ROMK reduziert und die Kaliumsekretion damit vermindert werden (San-Christobal et al. 2008). Die von O`Reilly et al. (2006) beobachtete Steigerung der mRNA-Expression der

WNK4 nach kaliumreicher Diät würde durch den Switch der Natriumresorption zwischen NCC und ENaC die Kaliumsekretion fördern.

Die Aldosteron-induzierte Kinase SGK1 (Serum-glucocorticoid-induced kinase 1)

Unter kaliumarmer Diät reduzierten die Wildtyp-Mäuse tendenziell die mRNA-Expression der SGK1 Kinase (nicht signifikante Abnahme um 40%). Dieses Ergebnis deutet die enge Korrelation zwischen Aldosteron und der SGK1 Kinase an. Unter kaliumreicher Diät wurde bei den Wildtyp-Mäusen keine signifikante Änderung des mRNA-Expressionslevels nachgewiesen. Somit konnte der vermutete Aldosteronspiegelanstieg durch die kaliumreiche Diät nicht in Form einer Steigerung der mRNA-Expression von SGK1 beobachtet werden.

Die SGK1 Kinase soll eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung des Aldosteroneffekts auf die Regulierung des Kaliumhaushaltes spielen (Wang und Giebisch 2009). So beschrieben Huang et al. (2004), dass SGK1-Knock-out-Mäuse nach hoher Kaliumdiätgabe eine verschlechterte Kaliumsekretion zeigten. Die Steigerung der Kaliumsekretion durch SGK1 soll auf der Förderung der Exozytose des Kaliumkanals ROMK vom Endoplasmatischen Retikulum in die Zellmembran beruhen (Wang und Giebisch 2009). Des Weiteren wurden zwei SGK1-Phosphorylierungsseiten im C-Terminus der WNK4 nachgewiesen (Ring et al. 2007b). In *Xenopus laevis*-Studien wurde gezeigt, dass die SGK1 Kinase durch Phosphorylierung der WNK4 deren Hemmung auf den Kaliumkanal ROMK (Ring et al. 2007b) und den Natriumkanal ENaC (McCornick et al. 2008) aufhebt. In *Xenopus laevis*-Studien konnten Vallon et al. (2005) nachweisen, dass die Coexpression von ENaC und SGK1 zu einer gesteigerten Natriumkanalaktivität führt. Dies beruht einerseits auf der quantitativen Erhöhung der ENaC-Kanäle an der Zelloberfläche; andererseits steigert die SGK1 die Öffnungswahrscheinlichkeit von ENaC-Kanälen (Vallon et al. 2005). Damit könnte ein Aldosteronanstieg bei Hyperkaliämie verbunden mit der gesteigerten Expression der KS-WNK1 und SGK1 zu einer vermehrten Öffnung des ENaC-Kanals und zu einem erhöhten Natriumeinstrom führen (Xu et al. 2005b). Damit würde der für die Kaliumsekretion benötigte elektrochemische Gradient aufgebaut.

Die in den hier durchgeführten Untersuchungen beobachtete Tendenz der mRNA-Expressionsabnahme von SGK1 unter kaliumarmer Diät hätte zur Folge, dass die SGK1-vermittelte WNK4-Hemmung aufgehoben würde (vgl. Abb.3). Dadurch würde die Hemmung des Kaliumkanals ROMK und des Natriumkanals ENaC durch die WNK4 gesteigert werden. Gleichzeitig würde die Öffnungswahrscheinlichkeit des Natriumkanals ENaC bedingt durch die SGK1-Abnahme sinken. Damit könnte unter kaliumarmer Diät eine vermehrte elektroneutrale Natriumresorption über den NCC-Transporter gefördert werden. Es würde zu einem Shift von der elektrogenen zur elektroneutralen Natriumresorption kommen.

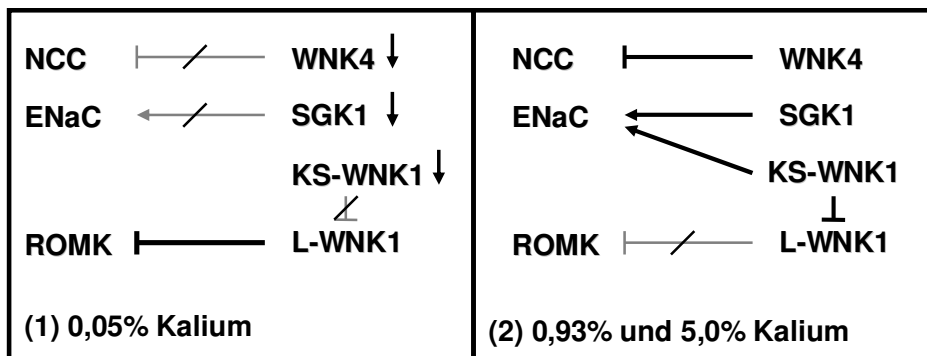


Abb. 29: Zusammenfassung der beobachteten Tendenzen hinsichtlich der Änderungen der mRNA-Expression von WNK Kinasen und SGK1 sowie deren möglichen Folgen bei den Wildtyp-Mäusen unter Kaliumdiät

(1) 0,05%-Kaliumdiät: Unter kaliumarmer Diät deutet sich eine Abnahme der mRNA-Expression von WNK4 an. Bedingt hierdurch könnte die Hemmung des Natriumtransporters NCC reduziert werden. Durch die sich ebenfalls andeutende Reduktion der mRNA-Expression von SGK1 würde der Natriumkanal ENaC nicht mehr gefördert. Es könnte vermehrt eine elektroneutrale Natriumresorption über den NCC-Kanal stattfinden. Gleichzeitig könnte die Hemmung der L-WNK1 durch die tendenziell verminderte mRNA-Expression der KS-WNK1 entfallen. Damit könnte der Kaliumkanal ROMK durch die L-WNK1 gehemmt werden, so dass eine verminderte Kaliumsekretion die Folge wäre.

(2) 0,93%- und 5,0%-Kaliumdiät: Unter Standarddiät und kaliumreicher Diät könnte es zu einer Hemmung des Natriumtransporters NCC durch WNK4 kommen. Die KS-WNK1 und die SGK1 könnten zu einer Förderung des Natriumkanals ENaC führen. Damit könnte eine vermehrte elektrogene Natriumresorption über den ENaC-Kanal stattfinden. Gleichzeitig könnte die L-WNK1 verstärkt durch die KS-WNK1 gehemmt werden. Damit würde die Hemmung des Kaliumkanals ROMK aufgehoben, so dass eine verstärkte Kaliumsekretion die Folge wäre.

4.2.5 Weitere mögliche Aldosteronziele

Das Protein CHIF (channel-inducing factor gene)

Als ein mögliches weiteres Aldosteronziel wird das Protein CHIF diskutiert. CHIF gehört zur Familie der FXYD Proteine, die eine Genfamilie von kleinen Membran-Proteinen bildet, die sich auf der Basis einer nicht veränderten

Aminosäuresequenz mit dem FYXD-Motiv und zwei konservierten Glycin- sowie einem Serin-Rest definiert. Mindestens fünf der sieben Familienmitglieder in Säugetieren interagieren mit der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ und sollen diese gewebe- und isoformspezifisch regulieren (Geering 2006). CHIF (FXFD4) wird im medullären Sammelrohr und in den Papillen sowie im distalen Kolon exprimiert und ist mit der α -Untereinheit der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ spezifisch assoziiert, deren Transporteigenschaften sie modifizieren soll (Pihakaski-Maunsbach et al. 2006).

Bei Veränderung der Kaliumzufuhr zeigte sich in den hier durchgeführten Untersuchungen bei Wildtyp-Mäusen sowohl nach kaliumarmer als auch nach kaliumreicher Diät eine leichte Tendenz zur Reduktion des mRNA-Expressionsniveaus von CHIF (nicht signifikante Abnahme um 29% nach kaliumarmer bzw. um 25% nach kaliumreicher Diät). In der Literatur wurde berichtet, dass die Regulation der CHIF-Expression in der Niere und im distalen Kolon unterschiedlich sei. So induzierte Aldosteron die Expression der CHIF mRNA nur im Kolon und nicht in der Niere (Brennan und Fuller 1999, Wald et al. 1997). Eine niedrige Natriumaufnahme erhöhte die CHIF mRNA und Proteinexpression im Kolon, aber nur die CHIF-Proteinexpression und nicht die mRNA-Expression in der Niere (Capurro 1996, Shi et al. 2001). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine signifikante Änderung der CHIF-Menge in Abhängigkeit von der Kaliumaufnahme nur auf Ebene der Proteinexpression beobachtbar ist. Studien mit CHIF-Knock-out Mäusen zeigten, dass der Verlust von CHIF offensichtlich vollständig in der Niere kompensiert wird. Im distalen Kolon wird dagegen die Natriumresorption reduziert (Goldschmidt et al. 2004). Die Funktion des Proteins CHIF in der Niere wird zurzeit eher in der Regulierung der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ vermutet. So induziert CHIF einen zwei- bis dreifachen Anstieg der Affinität der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ für intrazelluläres Natrium und soll damit eine effiziente Natriumresorption bei niedriger intrazellulärer Natriumkonzentration erlauben (Geering 2006).

Das Glukose regulierte Protein 58 (GRP58)

Die Wildtyp-Mäuse reduzierten tendenziell in den hier durchgeführten Untersuchungen die GRP58 mRNA-Expression nach Verabreichung kaliumarmer Nahrung (nicht signifikante Abnahme um 49%). Diese angedeutete Veränderung stimmt mit der beobachteten tendenziellen Abnahme der NCC mRNA-Expression überein. Den vermuteten funktionellen Zusammenhang zwischen dem Glucose-regulierten Protein und dem NCC-Kanal zeigten Wyse et al. (2002) in *Xenopus laevis* Oozyten-Studien, bei denen die GRP58-Expression die NCC-vermittelte Natriumaufnahme steigerte. Es wird über eine mögliche Rolle von GRP58 in der Regulierung der Endo- und Exozytose von NCC in bzw. aus der apikalen Plasmamembran diskutiert, da NCC auch in einem subapikalen Pool nachgewiesen worden ist. Alternativ wird auch in Erwähnung gezogen, dass GRP58 eine Funktion als Chaperon einnimmt, das den Wechsel zwischen glykolysierten (und damit funktionstüchtigen) und nicht-glykolysierten NCC-Kanälen steuert (Wyse et al. 2002).

Der luminale Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter 2 (NKCC2)

Für den elektroneutralen Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter 2 (NKCC2), der sich im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (TAL) befindet, wurde in dieser Arbeit bei den Wildtyp-Mäusen nach Gabe der kaliumarmen Diät eine nicht signifikante Abnahme der mRNA-Expression um 51% beobachtet. Diese Tendenz stimmt mit den Ergebnissen der Studie von Elkjaer et al. (2002) überein, in der eine signifikante Reduzierung der mRNA-Expression von NKCC2 im TAL und in der äußeren Medulla bei hypokaliämischen Ratten beschrieben wurde. Auch Mennit et al. (2000) berichteten von einer signifikanten Abnahme des NKCC2 Proteinniveaus in der Zellmembran im TAL. Gleichzeitig beobachteten sie auch eine signifikante Reduktion der ROMK Proteinexpression im TAL. Die Hauptfunktion von ROMK im TAL wird in der Kaliumsekretion über die apikale Membran und damit in der Unterstützung der Funktion von NKCC2 gesehen. Eine Abnahme der Funktion von NKCC2 und ROMK im TAL würde in einer niedrigeren NaCl-Resorption resultieren (Giebisch 1998). Mennit et al. (2000) folgerten, dass es unwahrscheinlich sei, dass die Reduzierung von ROMK und NKCC2 und damit eine Reduktion der NaCl-Aufnahme eine

physiologische adaptive Reaktion auf die reduzierte Kaliumaufnahme sei, da die Funktionsstörung beider Transporter das Bartter Syndrom hervorruft. Diese Erkrankung ist durch eine Störung der Urinkonzentrierung mit Flüssigkeitsverlust und chronischer Hypokaliämie gekennzeichnet ist (Kleta et al. 2006). Wie Kalium die mRNA-Expression von NKCC2 reduziert, ist bisher nicht bekannt.

4.3 Der Vergleich von Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen

4.3.1 Ergebnisse der Real-time PCR unter normaler Diät

BK β 1-Knock-out-Tiere weisen unter normaler Kaliumdiät einen erhöhten Aldosteronspiegel und eine Hypokaliämie auf. Durch Vergleich mit den Wildtyp-Tieren sollte der Effekt des erhöhten Aldosterons auf die Genexpression untersucht werden.

Beim Vergleich der BK β 1-Knock-out-Mäuse mit den Wildtyp-Mäusen unter normaler Diät zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression des Natriumtransporters NCC und des Natriumkanals ENaC. Während die NCC mRNA-Expression im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen bei den BK β 1-Knock-out-Tieren um 24% niedriger war, ließ sich bei Betrachtung des NCC/ENaC-Verhältnisses nur ein sehr geringer Unterschied von 14% zwischen den Tiergruppen feststellen. Überraschenderweise scheint ein erhöhter Aldosteronspiegel und das Vorliegen einer Hypokaliämie keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der NCC- und ENaC-Transporter zu haben.

Für die flussinduzierte Kaliumsekretion im distalen Nephron soll die β 1-Untereinheit des BK-Kanals beteiligt sein (Plutznick et al. 2003). Somit wäre bei den BK β 1-Knock-out-Tieren eine Störung des Kaliumhaushalts in Form einer Hyperkaliämie oder eine kompensatorische Veränderung der ROMK-Expression denkbar. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen an den BK β 1-Knock-out-Mäusen zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied bezüglich der mRNA-Expression des ROMK-Kanals zwischen BK β 1-Knock-out- und Wildtyp-Mäusen. Eine Hochregulation der mRNA-Expression vom Kaliumkanal ROMK, die als Folge des hohen Aldosteronspiegels und der Abwesenheit von funktionellen BK-Kanälen kompensatorisch auftreten

könnte, würde möglicherweise zu weiterem Kaliumverlust der Tiere, die bereits eine Hypokaliämie aufweisen, führen. Die BK β 1-Knock-out-Mäuse scheinen also auf das Fehlen des funktionellen BK-Kanals nicht mit einer ROMK mRNA-Expressionssteigerung zu reagieren. Allerdings kann keine Aussage über das Niveau der Proteinexpression und die Menge der ROMK-Kanäle in der apikalen Membran getroffen werden. Rieg et al. (2007) wiesen nach, dass bei BK α -Knock-out-Mäusen, die durch den Verlust der α -Untereinheit keine flussinduzierte Kaliumsekretion mehr zeigten, in der apikalen Membran sowohl bei Normaldiät als auch bei kaliumreicher Diät mehr ROMK-Kanäle exprimiert wurden als bei Wildtyp-Mäusen. Dabei wurde eine erhöhte Endo- bzw. Exozytose der ROMK-Kanäle zur apikalen Membran beobachtet, wohingegen sich die gesamte renale ROMK Proteinexpression nicht veränderte. Die relative Menge der ROMK mRNA veränderte sich in den mikrodisektierten CCD ebenfalls nicht. Dies korrespondiert mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Untersuchungen an BK β 1-Knock-out-Mäusen. Rieg et al. (2007) folgerten, dass die Kaliumhomöostase bei der Abwesenheit von BK-Kanälen durch einen kompensatorischen Anstieg des Aldosteronplasmaspiegels sowie durch eine Steigerung der ROMK-Proteinexpression und Abundanz in die Membran stabilisiert wird. Auf der anderen Seite wurde bei ROMK-Knock-out-Mäusen eine erhöhte Kaliumsekretion im distalen Nephron nachgewiesen, die sensitiv gegenüber dem BK-Blocker Iberotoxin ist (Bailey et al. 2006).

Die BK β 1-Knock-out-Tiere zeigten in den vorliegenden Untersuchungen keine im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren signifikant veränderte KS-WNK1 mRNA-Expression. Bei der Betrachtung des Verhältnisses der Isoformen der WNK1 ließ sich kein Unterschied zwischen den Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen beobachten. Auch die WNK4 mRNA-Expression war bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nicht signifikant verändert. Der Verlust der BK β 1-Untereinheit scheint somit keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der WNK Kinasen unter Normaldiät zu haben.

Bezüglich der SGK1 Kinase zeigte sich bei den BK β 1-Knock-out-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression. Dieses Ergebnis ist überraschend, da SGK1 als ein Aldosteron-

induzierte Gen gilt (Pearce et al. 2000, Shigaev et al. 2000) und die BK β 1-Knock-out-Tiere einen erhöhten Aldosteronplasmaspiegel aufweisen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zwischen den Wildtyp-Tieren und den BK β 1-Knock-out-Tieren unter Standarddiät bei den untersuchten Kinasen und Transportern mit Hilfe der Real-time PCR kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte.

4.3.2 Ergebnisse der Mikrodissektion

Bei den Untersuchungen der mikrodisssektierten Tubuliabschnitten zeigten die BK β 1-Knock-out-Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren keine signifikante Veränderung der NCC mRNA-Expression. Bei beiden Tiergruppen war deutlich zu erkennen, dass die Expression der NCC mRNA im DCT-Abschnitt des Nephrons gegenüber dem CT/CCD-Abschnitt sehr stark erhöht war. In der Literatur wird diskutiert, dass die NCC-Expression in Säugetier-Nieren auf die apikale Membran des DCT beschränkt sei (Golbang et al. 2006). Weitere Untersuchungen müssen klären, ob es tatsächlich noch zu einer geringen NCC-Transporterexpression im weiter distal liegenden Verbindungstubulus kommt oder ob die hier gemessenen Ergebnisse auf eine fehlerhafte Trennung beruhen.

Im CT/CCD wurde die ENaC mRNA im Vergleich zum DCT doppelt so stark exprimiert. Zwischen den Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Mäusen ließen sich im DCT und CT/CCD keine Unterschiede beobachten.

Bei der Betrachtung der mRNA-Expressionsrelation von NCC zu ENaC im DCT zeigte sich folglich kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp- und den BK β 1-Knock-out-Tieren. Der bei den BK β 1-Knock-out-Tieren vermutete Shift der Natriumresorption von der elektrogenen Aufnahme durch den ENaC zur elektroneutralen Aufnahme durch den Natriumtransporter NCC, um einer weiteren Kaliumsekretion entgegenzuwirken und somit eine Verstärkung der Hypokaliämie zu vermeiden, ließ sich nicht nachweisen.

Die Analyse der KS-WNK1 zeigte bei den Wildtyp-Mäusen, dass die mRNA-Expression vom DCT zum CT/CCD-Abschnitt um den Faktor 30 abnimmt. Dieses Ergebnis stimmt mit den in der Literatur beschriebenen

Beobachtungen überein. So ergaben Real-time PCR und In-Situ-Hybridisierung, dass die KS-WNK1-Expression im DCT/CNT am stärksten ist und zum weiter proximal gelegenen cTal-Abschnitt sowie zum weiter distal liegenden CT/CCD-Tubuliabschnitt abfällt (O`Reilly et al. 2006). Aufgrund der großen Streuung der Messdaten ließ sich keine vergleichende Aussage über die KS-WNK1 mRNA-Expression im DCT zwischen den Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Tieren treffen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei der Mikrodissektion keine signifikanten Unterschiede bezüglich der mRNA-Expression von NCC, ENaC und KS-WNK1 zwischen den Wildtyp- und BK β 1-Knock-out-Tieren zu beobachten waren. Bei beiden Tiergruppen war die NCC- und KS-WNK1 mRNA-Expression im DCT deutlich stärker, während ENaC vermehrt im CT/CCD-Tubuliabschnitt exprimiert wurde.

4.4 BK β 1-Knock-out-Mäuse unter Kaliumdiät

BK β 1-Knock-out-Mäuse weisen bereits eine chronische Hypokaliämie auf, so dass eine Reduzierung der Kaliumaufnahme durch eine Diät Reaktionen hervorrufen könnte, die in Wildtyp-Mäusen nicht zu beobachten sind.

4.4.1 Kaliumreduzierte Diät bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen

Bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen war nach Gabe der kaliumarmen Diät eine tendenziell stärkere Reduktion der mRNA-Expression des Natriumkanals ENaC als des Natriumtransporters NCC zu beobachten (nicht signifikante Abnahme um 23%). Bei den Knock-out-Tieren trat somit möglicherweise die Natriumaufnahme über den NCC verstärkt auf, so dass sich hier möglicherweise der in der Literatur (Wade et al. 2006) diskutierte Shift von der elektrogenen Natriumaufnahme via ENaC zur elektroneutralen Natriumaufnahme via NCC leicht andeutet. Dies würde die Kaliumsekretion unter kaliumarmer Diät über den Kaliumkanal ROMK reduzieren.

Die BK β 1-Knock-out-Mäuse reduzierten ihre mRNA-Expression des ROMK-Kanals nach kaliumarmer Diät um die Hälfte (keine Signifikanz nachweisbar).

Da diese Tiere bereits eine Hypokaliämie aufwiesen, scheint die kaliumarme Diät eine Stimulation für die Reduktion der mRNA-Expression darzustellen. Die BK β 1-Knock-out-Mäuse könnten mit der reduzierten ROMK mRNA-Expression einen weiteren Kaliumverlust verhindern. In der Literatur wird beschrieben, dass das Plasmaaldosteron unter kaliumarmer Diät bei Wildtyp-Mäusen unterdrückt wird und sich die Menge an ROMK durch einen Anstieg der Internalisierung und Degradation reduziert (Wang 2004). Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Untersuchungsergebnisse deuten an, dass die Abnahme von ROMK zur Reduktion der Kaliumsekretion dabei nicht nur auf Endozytose und Degradation des Kanals beruhen könnte, sondern sich auch in der Abnahme der mRNA-Expression des ROMK widerspiegeln könnte.

Bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen war die mRNA-Expression aller WNK Kinasen nach kaliumarmer Diät tendenziell reduziert, dabei aber die mRNA-Expression von KS-WNK1 doppelt so stark wie bei L-WNK1 und WNK4 (vgl. Abb. 30). Das Verhältnis von KS-WNK1 zu L-WNK1 als zentrales Steuerungselement bei der Regulierung des Kaliumhaushalts (Wade et al. 2006) war bei den BK β 1-Knock-out-Tieren im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren signifikant verändert. Bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen war das Verhältnis zwischen den Isoformen der WNK1 signifikant zugunsten von L-WNK1 verschoben (Änderung von 47% des relativen Verhältnisses von KS-WNK1 zu L-WNK1, vgl. Abb. 22). Damit könnte nach dem in Abschnitt 4.2 bereits vorgestellten Regulationsmodell die Hemmung von KS-WNK1 auf L-WNK1 reduziert werden, und die Blockierung des ROMK-Kanals durch die L-WNK1-Isoform würde ermöglicht werden. Gleichzeitig könnte die L-WNK1 die WNK4 hemmen, so dass die Hemmung des elektroneutralen NCC-Transporters aufgehoben und der Shift von ENaC zu NCC gefördert werden könnte. Die BK β 1-Knock-out-Mäuse mit chronisch erhöhtem Aldosteron und Hypokaliämie könnten also der diätbedingt geringeren Kaliumaufnahme mit der Verschiebung des WNK1-Isoformen-Verhältnisses entgegenwirken, so dass ein weiterer Kaliumverlust über die ROMK-Kanäle vermieden würde (vgl. Abb. 30).

Zusätzlich bewirkte die Reduzierung der Kaliumaufnahme bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen eine tendenzielle Abnahme der mRNA-Expression der SGK1 (nicht signifikant um 40%), das als zentrales Element bei der

Vermittlung des Aldosteroneffekts auf die Kaliumsekretion gilt (Wang und Giebisch 2009). Da die SGK1-Kinase auch die Effekte von WNK4 auf NCC, ROMK und ENaC beeinflusst, würde über eine Verminderung der SGK1-Aktivität die Hemmung des ROMK- und ENaC-Kanals durch die WNK4 gefördert werden (McCornick et al. 2008). Gleichzeitig würde die Öffnungswahrscheinlichkeit des Natriumkanals ENaC bedingt durch die SGK1-Abnahme sinken (Vallon et al. 2005), so dass eine vermehrte elektrogene Natriumresorption verbunden mit Kaliumsekretion bei den bereits hypokaliämischen BK β 1-Knock-out-Mäuse vermieden würde.

Nach kaliumarmer Diät verringerte sich bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen die GRP58 mRNA-Expression nicht signifikant um 49% und die CHIF mRNA-Expression um 44%. Damit war die gleiche Regulierung der mRNA-Expression wie bei den Wildtyp-Mäusen zu beobachten. Dies gilt ebenfalls für die mRNA-Expression des Natriumkaliumcotransporters NKCC2, der bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen reduziert war (nicht signifikante Abnahme um 57%).

Zusammenfassend zeigt sich, dass die kaliumreduzierte Diät bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen ähnliche Auswirkungen wie bei den Wildtyp-Mäusen verursachte. Allerdings waren die beobachteten Veränderungen aufgrund der veränderten Ausgangssituation der BK β 1-Knock-out-Tiere in Form des chronisch erhöhten Plasmaaldosteronspiegels und der bereits vorhandenen Hypokaliämie stärker ausgeprägt. Der in der Literatur diskutierte Shift der Natriumresorption zwischen NCC- und ENaC-Kanal ließ sich bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen als Tendenz beobachten. Nach kaliumarmer Diät verschob sich dieser Shift in Richtung der elektroneutralen NCC-Transporter. Auch führte die bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen nachgewiesene signifikante Veränderung des KS-WNK1/L-WNK1-Verhältnisses möglicherweise zu einer Reduktion der Kaliumsekretion. Die erhöhte Expression von L-WNK1 zu KS-WNK1 würde zur Blockade des ROMK-Kanal führen (vgl. Abb. 30).

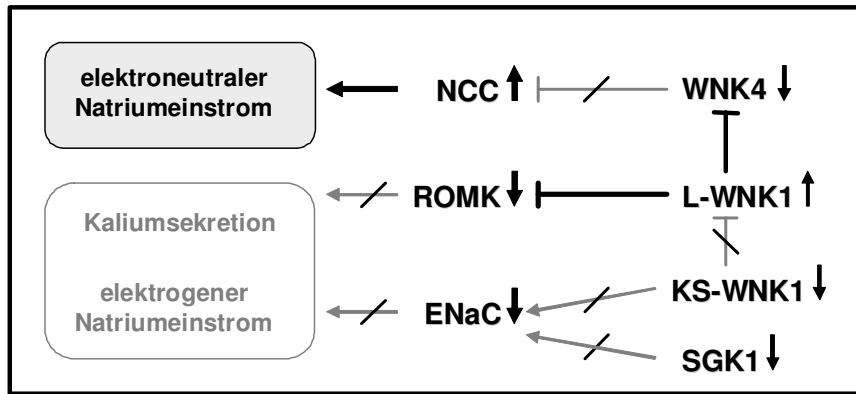


Abb. 30: Beobachtete tendenzielle bzw. signifikante Auswirkungen der kaliumarmen Diät auf die mRNA-Expression der WNK Kinasen und Transporter sowie deren möglichen Folgen bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen im Regulationsmodell:

Das Verhältnis der Isoformen der WNK1 verschob sich von KS-WNK1 signifikant zugunsten von L-WNK1. Es könnte also zu einer verstärkten Hemmung des Kaliumkanals ROMK kommen, so dass die Kaliumsekretion reduziert würde. Die beobachtete tendenzielle Abnahme der WNK4 könnte zur Aufhebung der Hemmung des Natriumtransporters NCC führen. Gleichzeitig würde die Förderung des Natriumkanals ENaC aufgrund der beobachteten tendenziellen Reduktion von KS-WNK1 und SGK1 entfallen. Es könnte ein Shift von der elektrogenen Natriumresorption (ENaC) zur elektroneutralen Natriumresorption (NCC) resultieren.

4.4.2 Kaliumreiche Diät bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen

Nach kaliumreicher Diät zeigten die BK β 1-Knock-out-Mäuse eine Tendenz, die NCC/ENaC mRNA-Expressionsrelation zugunsten von NCC zu verschieben. Dabei war nur die mRNA-Expressionsrate des NCC-Transporters tendenziell erhöht (nicht signifikante Zunahme um 24%), während die Menge der ENaC-mRNA auf gleichem Niveau wie unter Standarddiät blieb. Diese Ergebnisse sind überraschend: Zur Steigerung der Kaliumsekretion wäre eher eine Abnahme der mRNA-Expression des NCC-Transporters und eine Zunahme der mRNA-Expression des ENaC-Kanals vermutet worden. Möglicherweise wurde der Diäteeffekt der hohen Kaliumgabe durch die chronische Hypokaliämie der BK β 1-Knock-out-Tiere abgeschwächt. Nach kaliumreicher Diät konnte bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen keine Veränderung der ROMK mRNA-Expression beobachtet werden. In der Literatur finden sich Kaliumdiätstudien mit BK α -Knock-out-Mäusen, die keine funktionstüchtige α -Untereinheit des BK-Kanals besaßen und somit keine flussinduzierte Kaliumsekretion zeigten. Sie wiesen trotz konstantem Reninspiegel einen stark erhöhten Plasmaaldosteronspiegel auf (Rieg et al.

2007). Der Kaliumplasmaspiegel der BK α -Knock-out-Tiere war sowohl unter Normaldiät als auch unter kaliumreicher Diät mit demjenigen von Wildtyp-Mäusen vergleichbar. Ebenso war die Kaliumurinexkretion unter niedriger und hoher Kaliumdiät identisch mit derjenigen von Wildtyp-Tieren (Rieg et al. 2007). Da die BK α -Knock-out-Mäuse eine erhöhte Anzahl von ROMK-Kanälen aufwiesen, wurde von den Autoren vermutet, dass der hohe Anteil an Plasmaaldosteron in BK α -Knock-out-Mäusen die gesteigerte renale ROMK Proteinexpression induziere und dass ROMK dadurch die Abwesenheit von funktionstüchtigen BK-Kanälen kompensiere (Rieg et al. 2007). Ebenso zeigten ROMK-Knock-out-Mäuse (Bailey et al. 2006) eine Hochregulation der Kaliumsekretion im distalen Nephron, die sensitiv gegenüber dem BK-Blocker Iberiotoxin ist. Die Kaliumsekretion wurde bei diesen ROMK-Knock-out-Mäusen durch die BK-Kanäle aufrechterhalten (Bailey et al. 2006). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass sowohl die BK-Kanäle als auch die ROMK-Kanäle beim Ausfall der jeweils anderen kompensatorisch hochreguliert werden können und somit vor einer Hyperkaliämie schützen können (Samsom und Welling 2007). Die kompensatorische Hochregulation der ROMK mRNA konnte in der vorliegenden Arbeit bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen nicht gezeigt werden. Die Kompensation erfolgt möglicherweise durch eine Aktivitätssteigerung oder vermehrten Einbau des ROMK in der Membran (Wang 2006) und wäre somit mit den hier angewendeten Untersuchungsverfahren nicht nachweisbar. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die vorliegende Hypokaliämie der BK β 1-Knock-out-Mäuse den Effekt einer Hochkaliumdiät abschwächte.

Auch wurde die Beteiligung weiterer Kanäle im ASDN, wie z.B. der Kaliumchlorid-Cotransporter oder der Kaliumkanal Kv1.3 (Carrisova-Gaytan et al. 2010), in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. So wird eine natriumunabhängige Kaliumsekretion in den Zwischenzellen diskutiert, die neben dem BK-Kanal den Kaliumkanal Kv1.3 und einen Chloridkanal auf der apikalen Seite sowie die Na⁺-K⁺-ATPase, den NKCC1 und einen Oubain-sensitiver Natriumaustauscher auf der basolateralen Seite voraussetzt (Rodan et al. 2011).

Im Rahmen der Analysen der mRNA-Expression der WNK Kinasen bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen zeigten sich nach kaliumreicher Diät keine

signifikanten Änderungen. Insbesondere konnte der in der Literatur diskutierte Switch der WNK1-Isoformen als Regulationsmodell des WNK-Pathways (Wade et al. 2006) hier nicht beobachtet werden. Die Ursache könnte möglicherweise in der bereits bestehenden Hypokaliämie der Knock-out-Tiere begründet sein, so dass die erhöhte Kaliumaufnahme von diesen Tieren eventuell ohne Expressionsänderung toleriert werden konnte.

Nach kaliumreicher Diät konnte bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen keine Änderung der mRNA-Expression von SGK1, GRP58, CHIF und NKCC2 gegenüber normaler Kaliumdiät beobachtet werden.

Zusammenfassend betrachtet ließen sich bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen unter kaliumreicher Diät keine Unterschiede zu den Wildtyp-Mäusen feststellen und darüber hinaus auch keine Ansätze des in der Literatur diskutierten Switch der WNK1-Isoformen KS-WNK1/L-WNK1 erkennen (Wade 2006).

4.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Veränderung der Genexpression im distalen Nephron können zum Verständnis beitragen, wie die WNK Kinasen und die durch diese regulierten Ionentransporter in der Niere zur Aufrechterhaltung der Natrium- und Kalium-Homöostase und damit zur Stabilisierung des arteriellen Blutdrucks beitragen. Ziel ist es, mit Hilfe genauerer Erkenntnis über die physiologischen Funktion der WNK Kinasen neue Hemmstoffe zur Therapie der Hypertonie zu entwickeln.

Die Tatsache, dass die Prävalenz von Bluthochdruck positiv mit der Natriumaufnahme korreliert ist, ist schon lange nachgewiesen (Dahl 1972). Mit dem in der letzten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts beobachteten Anstieg der Hypertonieprävalenz in den Industriestaaten ging allerdings nicht nur ein Anstieg der Natriumaufnahme einher, sondern auch gleichzeitig ein deutlicher Rückgang der Kaliumaufnahme (Huang et al. 2008a). Langford wies bereits 1983 darauf hin, dass die geringe Kaliumaufnahme als möglicher Verursacher von Hypertonie zu betrachten ist (Langford 1983). Huang et al.

(2008a) wiesen später nach, dass eine kaliumarme Ernährung mit einer salzsensitiven Erhöhung des Blutdrucks einhergeht. Die Menge der Kaliumaufnahme ist dabei umgekehrt proportional zur Prävalenz von Bluthochdruck (Huang und Kuo 2007).

Es ist von entscheidender Bedeutung, die Rolle der WNK Kinasen bei der Regulation des Kalium- und Natrium-Haushalts zu definieren, da genetische Veränderungen der WNK Kinasen deutlich mit der Entstehung von arterieller Hypertonie assoziiert sind. Ein Beispiel ist das Gordon-Syndrom (PHAII), das durch eine Mutation der WNK1 oder WNK4 hervorgerufen wird (Wilson et al. 2001). Auch ist das WNK4-Gen im Chromosom 17 nur 1 Mb vom Locus D17S1299 entfernt, der in der Framingham-Heart-Studie als Haupteinflussfaktor für Blutdruck gedeutet wird. Neuere Studien lassen auf eine Assoziation von SNP oder Varianten von PRKWNK1 und PRKWNK4 mit arteriellen Blutdruck schließen (San-Cristobal et al. 2008). Bei der durch niedrige Kalium- und hohe Natriumaufnahme verursachten Hypertonie wurde eine Veränderung des L-WNK1 zu KS-WNK1 Verhältnisses in der Niere diskutiert (Huang et al. 2008a).

Mögliche Ansatzpunkte für den Einsatz von Medikamenten könnten sich auch aus den Ergebnissen von Modellen genetisch veränderter Mäuse ableiten lassen (San-Cristobal et al. 2008). So zeigten heterozygote Mäuse mit L-WNK1-Deletion einen signifikant niedrigeren Blutdruck als Wildtyp-Mäuse und überlebten bis ins Erwachsenenalter, während homozygote Knock-out-Tiere sofort starben (Zambrowicz et al. 2003). Laloti et al. (2006) untersuchten transgene Mäuse, die übermäßig viel Wildtyp-WNK4 oder PHAII-WNK4 exprimierten. Als Folge einer verstärkten Expression von Wildtyp-WNK4 ergab sich ein Phänotyp, der Ähnlichkeiten mit dem Gitelman Symptom aufwies, das auf einem Ausfall von NCC beruht. Die transgenen Mäuse mit der PHAII-WNK4-Mutation zeigten dagegen einen erhöhten Blutdruck.

So wird es in Zukunft die Aufgabe sein, weitere in-vivo Modelle zu entwickeln, um das Verhalten der WNK Kinasen und deren Interaktion mit anderen Kinasen, z.B. SGK1, in verschiedenen physiologischen Situationen zu

untersuchen. Die genaue Kenntnis der physiologischen Rolle der Kinase während einer veränderten Natrium- und Kaliumaufnahme stellt die Grundlage für ein gezieltes Eingreifen in den Elektrolyttransport im distalen Nephron dar.

5. Zusammenfassung

Im distalen Nephron der Niere sollen die WNK Kinasen eine unabhängige Steuerung der Kaliumresorption von der Natriumresorption ermöglichen. Der WNK-Pathway sorgt dafür, dass nach Aldosteronfreisetzung bei Hypovolämie bzw. Hyperkaliämie eine WNK-vermittelte selektive Aktivierung der Natriumtransporter NCC bzw. ENaC erfolgt und damit ein Shift zwischen der elektroneutralen Natriumresorption im distalen Tubulus und der elektrogenen Natriumresorption im Sammelrohr ermöglicht wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die differentielle Genexpression im distalen Nephron der Niere in zwei Mausmodellen, Wildtyp und BK β 1-Knock-out, untersucht. Die BK β 1-Knock-out-Tiere weisen durch den Verlust der BK β 1-Untereinheit einen chronisch erhöhten Plasmaaldosteronwert mit Hypertonie und Hypokaliämie auf. Mit Hilfe der Real-time PCR wurde die mRNA-Expression der Ionentransporter NKCC2, NCC, ENaC und ROMK sowie der regulierenden Proteine KS-WNK1, L-WNK1, WNK4, SGK1, CHIF und GRP58 im Kortex der Niere quantifiziert. Dabei ergab die Analyse keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der untersuchten Gene zwischen den Tiergruppen. Mit einer veränderten Kaliumdiät (0,05% bzw. 5,0% Kalium) wurde ein möglicher Einfluss auf den WNK-Pathway auf dem Niveau der mRNA-Expression untersucht. Bei den Wildtyp-Mäusen wurde nach kaliumarmer Diät eine Tendenz der mRNA-Expressionsabnahme von WNK4, SGK1 und KS-WNK1 sowie ENaC und ROMK beobachtet. Nach kaliumreicher Diät zeigten die Wildtyp-Tiere keine Änderung der mRNA-Expression. Bei den BK β 1-Knock-out-Mäusen wurde durch die kaliumarme Diät eine signifikante Verschiebung des mRNA-Verhältnisses KS-WNK1/L-WNK1 zu Gunsten der L-WNK1 mRNA und eine tendenzielle (nicht signifikante) Verschiebung des mRNA-Verhältnisses NCC/ENaC zu Gunsten von NCC mRNA nachgewiesen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der WNK-Pathway bei hypokaliämischen Tieren unter kaliumarmer Diät auf dem Niveau der mRNA-Expression in die Regulierung des Elektrolythaushaltes eingreift. Mit dem sich hier andeutenden Shift der elektrogenen über ENaC zur elektroneutralen über NCC Natriumaufnahme würde die Kaliumsekretion über den ROMK-Kanal reduziert werden, so dass die BK β 1-Knock-out-Tiere einen weiteren Kaliumverlust bei bereits bestehender Hypokaliämie vermeiden könnten.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	endotheliales Angiotensin-Converting-Enzym
ASDN	Aldosteron-sensitives distales Nephron
AS	Aminosäure
aTL	ascending thin limb of Henle´s loop (aufsteigender dünner Teil der Henle Schleife)
ATP	Adenosintriphosphat
BK	big conductance Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanal
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cortex
°C	Celcius Grad
CCD	cortical collecting duct (kortikales Sammelrohr)
CD	collecting duct (Sammelrohr)
cDNA	complementary DNA
CHIF	channel inducing factor
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COOH	Carboxygruppe
CT	connecting tubule (Verbindungstubulus)
cTal	cortical thick ascending limb of Henle´s loop (kortikaler Teil der dicken aufsteigenden Henle Schleife)
dATP	2´-Desoxy-Adenosin-5´-Triphosphat
dCTP	2´-Desoxy-Cytidin-5´-Triphosphat
dGTP	2´-Desoxy-Guanosin-5´-Triphosphat
dTTP	2´-Desoxy-Thymidin-5´-Triphosphat
DCT	distale convolute tubule (Pars convoluta des distalen Tubulus)
DEPC	Diethyldipyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease

dNTP	2'-Desoxy-Ribonukleosid-5'-Triphosphat
dT	Desoxythymidin
dTL	descending thin limb of Henle's loop (absteigender dünner Teil der Henle Schleife)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENaC	epithelial sodium channel
FIKS	flow-induced potassium secretion
FHHt	familial hyperkalemic hypertension (=PHAII, Gordon's syndrome)
g	Gramm
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GRP58	glucose regulated protein 58
GTC	Guanidinthiocyanat
H ⁺ -K ⁺ -ATPase	Protonen-Kalium-Pumpe
11β-HSD	11β-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase
IM	inner medulla (innerer Anteil der Medulla)
IMCD	inner medulla collecting duct (Sammelrohr der IM)
KCC	Kalium-Chlorid-Cotransporter
KCl	Kaliumchlorid
KO	Knock-out
K-Ras 2	Unterform von Ras (Rat sarcoma, Proto-Onkogen)
KS-WNK1	kidney-specific form of WNK1
L-WNK1	full-length long form of WNK1
M	Molar
Mat-8	8-kDa transmembrane protein (=FXVD3)
MEM	Eagle's minimal essential medium
ml	Milliliter
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mm	Millimeter
mM	Millimolar

mmHg	Millimeter Quecksilber
MR	Mineralkortikoid-Rezeptor
mRNA	messenger-RNA
mTAL	medullary thick ascending limb of Henle's loop, (medullärer dicker aufsteigender Teil der Henle Schleife)
NaCl	Natriumchlorid
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Natriumkalium-Adenosintriphosphatase
NCC	Natrium-Chlorid-Cotransporter
Nedd4-2	E3 ubiquitin-protein ligase
ng	Nanogramm
NHE3	Na ⁺ /H ⁺ exchanger type 3
NKCC	Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance
OD	Optische Dichte
OM	outer medulla (äußerer Anteil der Medulla)
OMCD	outer medulla collecting duct (Sammelrohr der OM)
OSR1	oxidative stress response kinase 1
PCT	proximal convoluted tubule (proximaler konvoluter Tubulus)
pH	pondus Hydrogenii
PHAII	Pseudohypoaldosteronism type II (=FHt, Gordon's syndrome)
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PST	proximal straight tubule (proximaler gerader Tubulus)
p-Wert	Signifikanzwert
RAAS	Renin-Angiotensin-II-Aldosteron-System
RNase	Ribonuklease
SEM	Standard Error of the Mean
SGK1	serum-glucocorticoid-induced kinase 1
siRNA	small interfering RNA
SPAK	Ste20-related proline-alanine-rich kinase

SNP(a)	single-nucleotide polymorphism
TAL	thick ascending limb (dicker aufsteigender Teil der Henle Schleife)
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TRPV4	TRP-Kanal (transient receptor potential channel) der Vanilloid-Rezeptor-Unterfamilie
U	Unit
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
Vol	Volumen
W	Watt
WNK	With-no-lysine-Kinase
WT	Wildtyp

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	<i>Schema des strukturellen Aufbaus eines juxtamedullären Nephrons.....</i>	12
Abbildung 2	<i>Diskutiertes Modell der Elektrolytregulation bei Hypovolemie und Hyperkaliämie: „WNK-Pathway“.....</i>	21
Abbildung 3	<i>Diskutierte Effekte der WNK Kinasen im distalen Nephron auf den Natrium- und Kaliumtransport.....</i>	22
Abbildung 4	<i>Stärke der NCC mRNA-Expression bei Wildtyp- und BKβ1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	52
Abbildung 5	<i>Stärke der ENaCβ mRNA-Expression bei Wildtyp- und BKβ1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	52
Abbildung 6	<i>Relation der durchschnittlichen NCC mRNA-Menge zur durchschnittlichen ENaCβ mRNA-Menge.....</i>	53
Abbildung 7	<i>Stärke der ROMK mRNA-Expression bei Wildtyp- und BKβ1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	53
Abbildung 8	<i>Stärke der KS-WNK1 mRNA-Expression bei Wildtyp- und BKβ1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	53
Abbildung 9	<i>Stärke der L-WNK1 mRNA-Expression bei Wildtyp- und BKβ1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	54
Abbildung 10	<i>Stärke der WNK4 mRNA-Expression bei Wildtyp- und BKβ1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	54
Abbildung 11	<i>Stärke der SGK1 mRNA-Expression bei Wildtyp- und BKβ1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	55
Abbildung 12	<i>Stärke der NCC mRNA-Expression im DCT und CT/CCD bei Wildtyp- und BKβ1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die L32 RNA-Menge.....</i>	56
Abbildung 13	<i>Stärke der ENaCβ mRNA-Expression im DCT und CT/CCD bei Wildtyp- und BKβ1-Knock-out-Mäusen, bezogen auf die L32 mRNA-Menge.....</i>	56

Abbildung 14	<i>Stärke der mRNA-Expression von NCC in Relation zu ENaCβ im distalen konvoluten Tubulus (DCT) bei Wildtyp- und BKβ1-Knock-out-Mäusen.....</i>	57
Abbildung 15	<i>Stärke der KS-WNK1 mRNA-Expression im DCT und CT/CCD bei Wildtyp- und BKβ1-Knock-out-Mäusen.....</i>	57
Abbildung 16	<i>Stärke der NCC mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	59
Abbildung 17	<i>Stärke der ENaCβ mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	59
Abbildung 18	<i>Stärke der NCC mRNA-Expression in Relation zur ENaCβ mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	60
Abbildung 19	<i>Stärke der ROMK mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	61
Abbildung 20	<i>Stärke der KS-WNK1 mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	62
Abbildung 21	<i>Stärke der L-WNK1 mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	63
Abbildung 22	<i>Stärke der KS-WNK1 mRNA-Expression in Relation zur L-WNK1 mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	63
Abbildung 23	<i>Stärke der WNK4 mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät, bezogen auf die μg-RNA-Menge.....</i>	64
Abbildung 24	<i>Stärke der SGK1 mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	65
Abbildung 25	<i>Stärke der GRP58 mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	65
Abbildung 26	<i>Stärke der CHIF mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	66
Abbildung 27	<i>Stärke der NKCC2 mRNA-Expression bei unterschiedlicher Kaliumdiät, bezogen auf die RNA-Menge.....</i>	67
Abbildung 28	<i>Regulationsschema der WNK Kinasen und luminalen Transporter bei Normaldiät und bei kaliumreicher Diät....</i>	70

Abbildung 29	<i>Zusammenfassung der beobachteten Tendenzen hinsichtlich der Änderungen der mRNA-Expression von WNK Kinasen und SGK1 sowie deren möglichen Folgen bei den Wildtyp-Mäusen unter Kaliumdiät</i>	79
Abbildung 30	<i>Beobachtete tendenzielle bzw. signifikante Auswirkungen der kaliumarmen Diät auf die mRNA-Expression der WNK Kinasen und Transporter sowie deren möglichen Folgen bei den BKβ1-Knock-out-Mäusen im Regulationsmodell.....</i>	88

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1a:	<i>Verwendete allgemeine Laborgeräte</i>	27
Tabelle 1b:	<i>Verwendete allgemeine Laborgeräte.....</i>	28
Tabelle 2:	<i>Verwendete Verbrauchsmaterialien.....</i>	29
Tabelle 3a:	<i>Verwendete Chemikalien.....</i>	30
Tabelle 3b:	<i>Verwendete Chemikalien.....</i>	31
Tabelle 4a:	<i>Verwendete Enzyme.....</i>	31
Tabelle 4b:	<i>Verwendete Enzyme.....</i>	32
Tabelle 5:	<i>Verwendete Biochemikalien.....</i>	32
Tabelle 6:	<i>Verwendete Kits.....</i>	33
Tabelle 7a:	<i>Verwendete Lösungen und Puffer.....</i>	33
Tabelle 7b:	<i>Verwendete Lösungen und Puffer.....</i>	34
Tabelle 7c:	<i>Verwendete Lösungen und Puffer.....</i>	35
Tabelle 8:	<i>Gruppeneinteilung der Tiere unter Kaliumdiät.....</i>	36
Tabelle 9a:	<i>Verwendete Primerpaare in der Real-time PCR.....</i>	45
Tabelle 9b:	<i>Verwendete Primerpaare in der Real-time PCR.....</i>	46
Tabelle 10a:	<i>Probenreihenfolge in der Real-time PCR.....</i>	47
Tabelle 10b:	<i>Probenreihenfolge in der Real-time PCR.....</i>	48
Tabelle 11a:	<i>Probenreihenfolge in der Real-time PCR bei den Mikrodissektionsproben</i>	48
Tabelle 11b:	<i>Probenreihenfolge in der Real-time PCR bei den Mikrodissektionsproben</i>	49

9. Literaturverzeichnis

Ambard L, Beaujard E (1904). Causes of arterial hypertension. Arch Gen Med 1: 520-530.

Amemiya T, Rocco VK, Warnock DG (1995). Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. Kidney Int 48: 1206-1215.

Ares GR, Caceres PS, Ortiz PA (2011). Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. Am J Physiol Renal Physiol 301: 1143-1159.

Arystarkhova E, Sweadner KJ (2005). Splice variants of the gamma subunit (FXVD2) and their significance in regulation of the Na,K-ATPase in kidney. J Bioenerg Biomembr. 37(6): 381-386.

Attali B, Latter H, Rachamin N, Garty H (1995). A corticosteroid-induced gene expressing an "IsK-like" K⁺-channel activity in Xenopus oocytes. Proc Natl Acad Sci USA 92: 6092-6096.

Bailey MA, Cantone A, Yan Q, MacGregor GG, Leng Q, Amorim JB, Wang T, Hebert SC, Giebisch G, Malnic G (2006). Maxi-K channels contribute to urinary potassium excretion in the ROMK-deficient mouse model of type II Bartter's syndrome and in adaptation to a high-K diet. Kidney Int 70: 51-59.

Bennett CF, Balcaarek JM, Varrichio A, Crooke ST (1988). Molecular cloning and complete amino-acid sequence of form-I phosphoinositide-specific phospholipase C. Nature 334: 268-270.

Birkenhagen R, Otto E, Schurmann MJ et al. (2001). Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. Nat Genet 29: 310-314.

Bostanjoglo M, Reeves WB, Reilly RF, Velázquez H, Robertson N, Litwack G, Morsing P, Dørup J, Bachmann S, Ellison DH (1998). 11β -Hydroxysteroid dehydrogenase, mineralocorticoid receptor and thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter expression by distal tubules. *J Am Soc Nephrol* 9: 1347-1358.

Brennan FE, Fuller PJ (1999). Acute regulation by corticosteroids of channel-inducing factor gene messenger ribonucleic acid in the distal colon. *Endocrinology* 140: 1213-1218.

Burg MB (1976). Tubular chloride transport and the mode of action of some diuretics. *Kidney Int* 9: 189-197.

Capurra C, Coutry N, Bonvalet JP, Escoubet B, Garty H, Farman N (1996). Cellular localization and regulation of CHIF in kidney and colon. *AM J Physiol* 271: 753-762.

Carrisoza-Gaytan R, Salvador C, Satlin LM, Liu W, Zamilowitz B, Bobadilla NA, Trujillo J, Escobar LI (2010). Potassium secretion by voltage-gated potassium channel Kv1.3 in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: 255-264.

Choe H, Zhou H, Palmer LG, Sackin H (1997). A conserve cytoplasmatic region of ROMK modulates pH sensitivity, conductance, and gating. *Am J Physiol* 273: 515-529.

Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 163: 156-159.

Chu PY, Quigley R, Babich V, Huang CL (2003). Dietary potassium restriction stimulates endocytosis of ROMK channel in rat cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: 1179-1187.

Coffmann TM, Crowley SD (2008). Kidney in Hypertension: Guyton Redux. Hypertension 51: 811-816.

Dahl LK (1972). Salt and hypertension. Am J Clin Nutr 25: 231-244.

Dahl LK, Heine M, Tassinari L (1962). Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess of salt ingestion. Nature 194: 480-482.

Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA, Münster C, Chairibi A, Pratt JH, Horisberger JD, Pearce D, Loffing J, Staub O (2001). Phosphorylation of Nedd4-2 by *sgk1* regulates epithelial Na⁺ channel cell surface expression. EMBO J 20: 7052-7059.

Delaloy C, Lu J, Houot AM, Disse-Nicodeme S, Gasc JM, Corvol P, 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.

Disse-Nicodeme S, Achard JM, Desitter I, Houot AM, Fournier A, Corvol P, Jeunemaitre X (2000). A new locus on chromosome 12p13.3 for pseudohypoaldosteronism type II, an autosomal dominant form of hypertension. Am J Hum Genet 67: 302-310.

Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis GM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of k⁺ conductance and selectivity. Science 280: 69-77.

Earley S, Heppner TJ, Nelson MT, Brayden JE (2005). TRPV4 forms a novel Ca²⁺ signalling complex with ryanodine receptors and BKCa channels. Circ Res 97: 1270-1279.

Elkjær ML, Kwon TH, Wang W, Nielsen J, Knepper MA, Frøklær J, Nielsen S (2002). Altered expression of renal NHE3, TSC, BSC-1, and ENaC subunits in potassium-depleted rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: 1376-1388.

Estilo G, Liu W, Pastor-Soler N, Mitchell P, Carattino MD, Kleyman TR, Satlin LM (2008). Effect of aldosterone on BK channel expression in the mammalian cortical collecting duct (CCD). *Am J Physiol Renal Physiol* 295: 780-788.

Frindt G, Palmer LG (2004). Apical potassium channels in rat connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: 1030-1037.

Frindt G, Palmer LG (2010). Effects of dietary K on cell-surface expression of renal ion channels and transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: 890-897.

Frindt G, Zhou H, Sackin H, Palmer LG (1998). Dissociation of K channel density and ROMK mRNA in rat cortical collecting tubule during K adaptation. *Am J Physiol* 274: 525-531.

Gamba G (2005). Role of WNK kinases in regulating tubular salt and potassium transport and in the development of hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: 245-252.

Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytten J, Lee WS, Hediger MA, Hebert SC (1994). Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 269: 17713-17722.

Garzon-Muvdi T, Pacheco-Alvarez D, Gagnon KB, Vazquez N, Ponce-Coria J, Moreno E, Delpire E, Gamba G (2007). WNK4 kinase is a negative regulator of K⁺-Cl⁻-cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: 1197-1207.

Geering K (2006). FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: 241-250.

Giebisch G (1998). Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 274: 817-833.

Golbang AP, Cope G, Hamad A, Murthy M, Liu C, Cuthbert AW, O'Shaughnessy KM (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: 1369-1376.

Goldbang AP, Murthy M, Hamad A, Liu CH, Cope G, Hoff WV, Cuthbert A, O'Shaughnessy KM (2005). A new kindred with pseudohypoaldosteronism type II and a novel mutation (564D→H) in the acidic motif of the WNK4 gene. *Hypertension* 46: 295-300.

Goldschmidt I, Grahammer F, Warth R, Schulz-Baldes A, Garty H, Greger R, Bleich M (2004). Kidney and colon electrolyte transport in CHIF knockout mice. *Cell Physiol Biochem* 14: 113-120.

Grimm PR, Sansom SC (2007). BK channel in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16: 430-436.

Grimm PR, Foutz RM, Brenner R, Sansom S (2007). Identification and localization of BK- β subunits in the distal nephron of the mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: 350-359.

Guyton AC (1991). Blood pressure control – special role of the kidneys and body fluids. *Science* 252: 1813-1816.

Guyton AC, Coleman TG, Cowley AV Jr, Scheel KW, Manning RD Jr, Norman RA Jr (1972). Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *Am J Med* 52: 584-594.

Hebert SC (1995). An ATP-regulated, inwardly rectifying potassium channel from rat kidney (ROMK). *Kidney Int* 48: 1010-1016.

Hebert SC, Andreoli TE (1984). Control of NaCl transport in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 246: 745-756.

Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC (1993). Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362: 31-38.

Huang CL, Kuo E (2007). Mechanism of disease: WNK-ing at the mechanism of salt-sensitive hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol* 3: 623-630.

Huang CL, Kuo E, Toto RD (2008a). WNK kinases and essential hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17: 133-137.

Huang CL, Yang SS, Lin SH (2008b). Mechanism of regulation of renal ion transport by WNK kinases. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17: 519-525.

Huang DY, Wulff P, Volkl H, Loffing J, Richter K, Kuhl D, Lang F, Vallon V (2004). Impaired regulation of renal K⁺ elimination in the *sgk1*-knock-out mouse. *J AM Soc Nephrol* 15: 885-891.

Igarashi P, Vanden Heuvel GB, Payne JA, Forbush B (1995). Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na-K-Cl cotransporter. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 269: 405-418.

Kahle KT, MacGregor GG, Wilson FH, , Van Hoek AN, Brown D, Ardito T, Kashgarian M, Giebisch G, Hebert SC, Boulpaep EL, Lifton RP (2004). Paracellular Cl⁻ permeability is regulated by WNK4 kinase: insight into normal physiology and hypertension. *Proc Natl Acad USA* 101: 14877-14882.

Kahle KT, Wilson FH, Leng Q, Lalioti MD, O'Connell AD, Dong K, Rapson AK, Macgregor GG, Giebisch G, Hebert SC, Lifton RP (2003). WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K⁺ secretion. *Nat Genet* 35: 372-376.

Kahle KT, Rinehart J, de los Heros P, Louvi A, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, Gamba G, Gimenez I, Lifton RP (2005a). WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16783-16788.

Kahle KT, Wilson FH, Lifton RP (2005b). Regulation of diverse ion transport pathways by WNK4 kinase: a novel molecular switch. *Trends Endocrinol Metab* 16: 98-103.

Kamynina E, Staub O (2002). Concerted action of ENaC, Nedd4-2 and SGK1 in transepithelial Na transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: 377-387.

Kleta R, Bockenhauer D (2006). Bartter Syndromes and Other Salt-Losing Tubulopathies. *Nephron Physiol* 104: 73-80.

Knepper MA, Kim GH, Masilamani S (2003). Renal tubule sodium transporter abundance profiling in rat kidney: response to aldosterone and variations in NaCl intake. *Ann NY Acad Sci* 986: 562-569.

Kobayashi K, Uchida S, Mizutani S, Sasaki s, Marumo F (2001). Intrarenal and cellular localization of CLC-K2 protein in the mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 12: 1327-1334.

Kunchaparty S, Palcso M, Berkman J, Velázquez H, Desir GV, Bernstein P, Reilly RF, Ellison DH (1999). Defective processing and expression of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a cause of Gitelman's syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 277: 643-649.

Lalioti MD, Zhang J, Volkman HM, Kahle KT, Hoffmann KE, Toka HR, Nelson-Williams C, Ellison DH, Flavell R, Booth CJ, Lu Y, Geller DS, Lifton RP (2006). Wnk4 controls blood pressure and potassium homeostasis via regulation of mass and activity of the distal convoluted tubule. *Nature Genetics* 38: 1124-1132.

Landau D (2006). Review: Potassium-related inherited tubulopathies. *Cell Mol Life Sci* 63: 1962-1968.

Langford HK (1983). Dietary potassium and hypertension: epidemiologic data. *Ann Intern Med* 98: 770-772.

Lazrak A, Liu Z, Huang CL (2006). Antagonistic regulation of ROMK by long and kidney-specific WNK1 isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1615-1620.

Leng Q, Kahle T, Rinehart J, MacGregor GG, Wilson FH, Canessa CM, Lifton RP, Hebert LS (2006). WNK3, a kinase related to genes mutated in hereditary hypertension with hyperkalemia, regulates the K⁺ channel ROMK1 (Kir1.1). *J Physiol* 571: 275-286.

Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS (2001). Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104: 545-556.

Liu Z, Wnag HR, Huang CL (2009). Regulation of ROMK Channel and K⁺ Homeostasis by Kidney-specific WNK1 Kinase. *J Biol Chem* 284(18): 12198-12206.

Mansfield TA, Simon DB, Farfel Z, Bia M, Tucci JR, Lebel M, Gutkin M, Viales B, Christofilis MA, Kauppinen-Makelin R, Mayan H, Risch N, Lifton RP (1997). Multilocus linkage of familial hyperkalaemia and hypertension pseudohypoaldosteronism type II, to chromosomes 1q31-42 and 17p11-q21. *Nat Genet* 16: 202-205.

Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA (1999). Aldosterone-mediated regulation of ENaC α , β and γ subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 104: 19-23.

McCormick JA, Yang CL, Ellison DH (2008). WNK Kinases and Renal Sodium Transport in Health and Disease. *Hypertension* 51: 588-596.

Meera P, Wallner M, Toro L (2000). A neuronal beta subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca^{2+} -activated K^{+} channels resistant to charybdotoxin and iberotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5562-5567.

Meneton P, Loffing J, Warnock DG (2004). Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: 593-601.

Mennit PA, Frindt G, Silver RB, Palmer LG (2000). Potassium restriction downregulates ROMK expression in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: 916-924.

Morsing P, Velazquez H, Wright FS, Ellison DH (1991). Adaptation of distal convoluted tubule of rats. II. Effects of chronic thiazide infusion. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 261: 137-143.

Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, Iemura S, Ucida S, Natsume T, Matsumoto K, 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.

Morton MJ, Hutchinson K, Mathieson PW (2004). Human podocytes possess a stretch-sensitive, Ca²⁺-activated K⁺-Channel: potential implications for the control of glomerular filtration. *J Am Soc Nephrol* 15: 2981-2987.

Mount DB, Gamba G (2001). Renal potassium-chloride cotransporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10: 685-691.

Muller OG, Parnova RG, Centeno G, Rossier BC, Firsov D, Horisberger JD (2003). Mineralcorticoid Effects in the Kidney: Correlation between α ENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA Expression and Urinary Excretion of Na⁺ und K⁺. *J Am Soc Nephrol* 14: 1107-1115.

Najjar F, Zhou H, Morimoto T, Bruns JB, Li HS, Liu W, Kleyman TR, Satlin LM (2005). Dietary K⁺ regulated apical membrane expression of maxi-K channels in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: 922-932.

Naray-Fejes-Toth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G, Fejes-Toth G (1999). SGK1 is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial Na channel. *J Biol Chem* 274: 16973-16978.

Naray-Fetes-Toth A, Snyder PM, Feyes-Toth G (2004). The kidney-specific WNK1 isoform is induced by aldosterone and stimulates epithelial sodium channel-mediated Na⁺ transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 17434-17439.

Obermüller N, Bernstein PL, Velázquez H, Reilly R, Moser D, Ellison DH, Bachmann S (1995). Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in rat and human kidney. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 269: 900-910.

Oliver JD, Roderick HL, Llewellyn DH, High S (1999). ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol Biol Cell* 10: 2573-2582.

O'Reilly M, Marshall E, Macgillivray T, Mittal M, Xue W, Kenyon CJ, Brown RW (2006). Dietary electrolyte-driven responses in the renal WNK kinase pathway in vivo. *J AM Soc Nephrol* 17: 2402-2413.

O'Reilly M, Marshall E, Speirs HJ, Brown RW (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.

Pearce D, Verry F, Chen SY, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Bhargava A (2000). Role of SGK in mineralcorticoid-regulated sodium transport. *Kidney Int* 57: 1283-1289.

Peng JB, Bell PD (2006). Cellular mechanisms of WNK4-mediated regulation of ion transport proteins in the distal tubule. *Kidney Int* 69: 2116-2118.

Pihakaski-Maunsbach K, Vorum H, Honoré B, Tokonabe S, Frøkiær J, Garty H, Karlish SJD, Maunsbach AB (2006). Locations, abundances, and possible functions of FXYD ion transport regulators in rat renal medulla. *Am J Physiol Renal Physiol* 291 (5): 1033-1044.

Plüger S, Faulhaber J, Fürstenau M, Lohn M, Waldschütz R, Gollasch M, Haller H, Luft FC, Ehmke H, Pongs O (2000). Mice with disrupted BK channel beta1 subunit gene feature abnormal Ca(2+) spark/STOC coupling and elevated blood pressure. *Circ Res* 87(11): E53-60.

Pluznick JL, Sansom SC (2006). BK channels in the kidney: role in K⁺ secretion and localization of molecular components. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: 517-529.

Pluznick JL, Wei P, Carmines PK, Sansom SC (2003). Renal fluid and electrolyte handling in BKCa-beta1^{-/-} mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: 1274-1279.

Reilly RF, Ellison DH (2000). Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiol Rev* 80: 277-313.

Rieg T, Vallon V, Sauabier U, Kaissling B, Ruth P, Osswald H (2007). The role of the BK channel in potassium homeostasis and flow-induced renal potassium excretion. *Kidney Int* 72: 566-573.

Ring AM, Cheng SX, Leng Q, Kahle KT, Rinehart J, Lalioti MD, Volkmann HM, Wilson FH, Hebert SC, Lifton RP (2007a). WNK4 regulates activity of the epithelial Na⁺ channel in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 4020-2024.

Ring AM, Leng Q, Rinehart J, Wilson FH, Kahle KT, Hebert SC, Lifton RP (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* 104: 4025-4029.

Rodan AR, Cheng CJ, Huang CL (2011). Recent Advances in distal tubular potassium handling. *Am J Physiol Renal Physiol* 300: 821-827.

Sackin H, Vasilyev A, Palmer LG, Krambis M (2003). Permeant cations and blockers modulate pH gating of ROMK channels. *Biophys J* 84: 910-921.

Samsom SC, Welling PA (2007). Two channels for one job. *Kidney Int.* 72: 529-530.

San-Cristobal P, de los Heros P, Ponce-Coria J, Moreno E, Gamba G (2008). WNK Kinases, Renal Ion Transport and Hypertension. *Am J Nephrol* 28: 860-870.

Schafer JA, Watkins ML, Li L, Herter P, Haxelmann S, Schlatter E (1997). A simplified method for isolation of large numbers of defined nephron segments. *Am J Physiol* 273: 650-657.

Scheinman SJ, Guay-Woodford LM, Thakker RV et al. (1999). Genetic disorders of renal electrolyte transport. *N Eng J Med* 340: 1177-1187.

Schlatter E, Schafer JA (1987). Electrophysiological Studies in principal cells of rat cortical collecting tubules. *Pflugers Arch* 409: 81-92.

Shi H, Levy-Holzman R, Cluzeaud F, Farman N, and Garty H (2001). Membrane topology and immunolocalization of CHIF in kidney and intestine. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: 505-512.

Shigaev A, Asher C, Latter H, Garty H, Reuveny R (2000). Regulation of sgk by aldosterone and its effects on the epithelial Na⁺channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: 613-619.

Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelam M, Gill JR Jr, Ulick S, Milora RV, Fidling JW, Canessa CM, Rossier BC, Lifton RP (1994). Liddle's Syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 79: 407-414.

Spindler B, Mastroberardino L, Custer M, Verrey F (1997). Characterization of early aldosterone-induced RNAs identified in A6 kidney epithelia. *Pflügers Arch* 434: 323-331.

Storner LC, Viggiano SC (1999). Elevation of basolateral K⁺ induces K⁺ secretion by apical maxi K⁺ channels in *Ambystoma* collecting tubule. *Am J Physiol Regular Integr Comp Physiol* 276: 616-621.

Subramanya AR, Yang CL, McCormick JA, Ellison DH (2006a). WNK kinases regulate sodium chloride and potassium transport by the aldosterone-sensitive distal nephron. *Kidney Int* 70 (4): 630-634.

Subramanya AR, Yang CL, Zhu X, Ellison DH (2006b). Dominant-negative regulation of WNK1 by its kidney-specific kinase-defective isoform. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: 619-624.

Subramanya AR, Liu J, Ellison DH, Wade JM, Welling PA (2009). WNK4 diverts the thiazide-sensitive NaCl cotransporter to the lysosome and stimulates AP-3 interaction. *J Biol Chem* 284: 18471-18480.

Vallon V, Wulff P, Huang DY, Loffing J, Völkl H, Kuhl D, Lang F (2005). Role of Sgk1 in salt and potassium homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: 4-10.

Van der Wal FJ, Oliver JD, High S (1998). The transient association of ERp57 with N-glycosylated proteins is regulated by glucose trimming. *Eur J Biochem* 256: 51-59.

Velazquez H, Bartiss A, Bernstein P, Ellison DH (1996). Adrenal steroids stimulate thiazide-sensitive NaCl transporter by rat renal distal tubules. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 270: 211-219.

Verrissimo F, Jordan P (2001). WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multicellular organisms. *Oncogene* 20: 5562-5569.

Vitari AC, Thastrup J, Rafiqi FH, Deak M, Morrice NA, Karlsson HK, Alessi DR (2006). Functional interactions of the SPAK/OSR1 kinases with their upstream activator WNK1 and downstream substrate NKCC1. *Biochem J* 397: 223-231.

Wade JB, Fang L, Liu J, Li D, Yang CL, Subramanya AR, Maouyo D, Mason A, Ellison DH, Welling PH (2006). WNK1 kinase isoform switch regulates renal potassium excretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8558-8563.

Wald H, Popovtzer MM, Garty H (1997). Differential regulation of CHIF mRNA by potassium intake and aldosterone. *AM J Physiol* 272: 617-623.

Wald H, Garty H, Palmer LG, Popovtzer MM (1998). Differential regulation of ROMK expression in kidney cortex and medulla by aldosterone and potassium. *Am J Physiol* 275: 239-245.

Wallner M, Meera P, Toro L (1999). Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channels: a transmembrane beta-subunit homolog. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4137-4142.

Wang B, Rothberg BS, Brenner R (2006). Mechanism of beta4 subunit modulation of BK channels. *J Gen Physiol* 127: 449-465.

Wang WH (2004). Regulation of renal K transport by dietary K intake. *Annu Rev Physiol* 66: 547-569.

Wang WH (2006). Regulation of ROMK (Kir1.1) channels: new mechanisms and aspects. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: 14-19.

Wang WH, Giebisch G (2009). Regulation of potassium (K) handling in the renal collecting duct. *Pflugers Arch* 458 (1): 157-168.

Welling PA, Chang YP, Delpire E, Wade JB (2010). Multigene kinase network, kidney transport, and salt in essential hypertension. *Kidney Int.* 77: 1063-1069.

Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X, Lifton RP (2001). Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293: 1107-1112.

Wilson FH, Kahle KT, Sabath E, Lalioti MD, Rapson AK, Hoover RS, Hebert SC, Gamba G, Lifton RP (2003). Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: The Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 680-684.

Woda CB, Bragin A, Kleyman TR, Satlin LM (2001). Flow-dependent K⁺secretion in the cortical collecting duct is mediated by a maxi-K channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: 786-793.

Wuttke W. (2000). Endokrinologie. In: *Physiologie des Menschen*. Schmidt RF, Thews G, Lang F (Hrg.), 28. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 396-397.

Wyse B, Ali N, Ellison DH (2002). Interaction with grp58 increases activity of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: 424-430.

Xu BE, English JM, Wilsbacher JL, Strippec S, Goldsmith EJ, Cobb MH (2000). WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem* 275: 16795-16801.

Xu BE, Strippec S, Lazrak A, Huang CL, Cobb MH (2005a). WNK1 activates SGK1 by a PI-3-kinase-dependent and non-catalytic mechanism. *J Biol Chem* 280: 34218-34223.

Xu BE, Strippec S, Chu PY, Lazrak A, Li XY, Lee BH, English JM, Ortega B, Huang CL, Cobb MH (2005b). WNK1 activates SGK1 to regulate the epithelial sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10315-10320.

Yang CL, Angell J, Mitchell R, Ellison DH (2003). WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *J Clin Invest* 111: 1039-1045.

Yang CL, Zhu X, Wang Z, Subramanya AR, Ellison DH (2005). Mechanisms of WNK1 and WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransporter. *J Clin Invest* 115: 1379-1387.

Yang L, Frindt G, Palmer LG (2010). Magnesium modulates ROMK channel-mediated potassium secretion. *J AM Soc Nephrol* 21: 2109-2126.

Zambrowicz BP, Abuin A, Ramirez-Solis R et al. (2003). WNK1 kinase deficiency lowers blood pressure in mice: a genetrapp screen to identify potential targets for therapeutic intervention. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 14109-14114.

Zhou H, Tate SS, Palmer LG (1994). Primary structure and functional properties of an epithelial K⁺ channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 266: C809-C824.

10. Danksagung

Frau Dr. rer. nat. Helga Vitzthum danke ich für ihre kompetente und freundliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für ihre Hilfestellung bei der technischen Ausführung der Versuche und der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Mein Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. med. Heimo Ehmke für die Überlassung des Themas und die Erlaubnis, die Einrichtungen des Institutes zu nutzen, sowie für seine Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit. Auch bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie bedanke ich mich recht herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre freundliche Aufnahme am Lehrstuhl.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mich während meiner Studienzeit und darüber hinaus immer unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Mann für seine jahrelange Geduld und Motivation beim Erstellen dieser Arbeit.

11. Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

12. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Tostedt, den 12.12.2013