Aus dem Department für Biomedizinische Wissenschaft der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik

(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Dr.med. Reinhold G. Erben)

# Phänotypisierung von Mäusen mit einem mutierten Kelchlike 3 Protein

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Viktoria Stegfellner

Wien, im Juni 2023

Betreuer: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Dr.med. Reinhold G. Erben

Co-Betreuerin: Judith Radloff, PhD

BegutachterIn: Ao.Univ.-Prof. Mag.rer.nat. Dr.rer.nat. Ingrid Walter

# Inhaltsverzeichnis

1.		Einlei	tung	1
	1.1.	Die	Niere	3
	1.	.1.1.	Aufbau der Niere	3
	1.	.1.2.	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	9
	1.	.1.3.	Natrium-Chlorid-Cotransporter (NCC)	10
	1.	.1.4.	Wirkung von Kelch-like Protein 3 (KLHL3) in der Niere	11
	1.2.	Нур	pertonie	11
	1.3.	Fra	gestellung	13
2.		Mater	ial und Methoden	14
	2.1.	Ver	suchstiere	14
	2.2.	Pro	bengewinnung, -aufbereitung & -analyse	14
	2.	.2.1.	Histologische Aufbereitung der Organe	16
	2.3.	His	tologische Färbungen	18
	2.	.3.1.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	18
	2.	.3.2.	Picro-Sirius-Red-Färbung	19
	2.4.	Mik	roskopische Auswertung der Schnitte	20
	2.5.	Sta	tistische Analyse	21
3.		Ergeb	nisse	22
	3.1.	Urir	n- und Serumanalytik	22
	3.2.	Kör	pergewicht und Verhältnis von Herzgewicht (HG) zu Körpergewicht (KG)	27
	3.3.	Erg	ebnisse der histologischen Auswertung	29
4.		Disku	ssion	33
5.		Zusar	nmenfassung	36
6.		Sumn	nary	37
7.		Abkür	zungsverzeichnis	38
8.		Abbilo	lungs-/ Tabellenverzeichnis	40

9.	Literaturverzeichnis	. 4	1
----	----------------------	-----	---

# 1. Einleitung

Kelch-like Protein 3 (KLHL3) ist ein Protein, das zur Familie der BTB-BACK-Kelch Familie gehört und mit dem Cullin 3 (CUL3) Protein den KLHL3-CUL3-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex bildet. Dieser Komplex markiert das in den Zellen des distalen Tubulus der Niere exprimierte Protein With-No-Lysin-Kinase 1 und 4 (WNK) zum Abbau.

Inaktivierende Mutationen im KLHL3 Protein verhindern eine adäquate Inaktivierung und einen vollständigen Abbau der WNK 1 und WNK 4 Proteine, dadurch wird der Natrium–Chlorid– Cotransporter (NCC) nicht dephosphoryliert (Sasaki et al. 2017). Die Transporter bleiben aktiv und es wird vermehrt Natrium und Chlorid in die Tubuluszellen aufgenommen. Durch die gesteigerte Natriumaufnahme über den NCC wird weniger Natrium über epitheliale Natriumkanäle (ENaC) reabsorbiert und dadurch auch weniger Kalium sezerniert. Es kommt neben der Erhöhung des Blutvolumens zu einer Hyperkaliämie. Die geringere Menge an sezernierten Kaliumionen hat zur Folge, dass über die Protonen-Kalium-Pumpe weniger Kalium aufgenommen wird und mehr Wasserstoffionen in den Tubuluszellen bleiben. Das führt zu einer verminderten renalen Ausscheidung von Wasserstoffionen und zu einem niedrigeren pH-Wert des Blutes. Sinkt der pH-Wert im Blut unter 7,35 liegt eine Azidose vor (Furusho et al. 2020).

Hypertonie ist eine komplexe multifaktorielle Erkrankung, die sowohl durch genetische Mutationen als auch durch Umwelteinflüsse verursacht und beeinflusst werden kann. Es wird angenommen, dass vor allem kaliumarme Diäten, zu hoher Salzkonsum, eine Hyperaktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und genetische Prädispositionen bei Menschen zu Bluthochdruck führen (Leong et al. 2015). Auch Mutationen der Enzyme WNK1, WNK4, CUL3 oder KLHL3 können zu der mit salzsensitiver Hypertonie assoziierten Erkrankung, dem sogenannten Pseudohypoaldosteronismus Typ 2 (PHA2) führen. PHA2 ist auch als Gordon-Syndrom oder familiäre hyperkaliämische Hypertonie (FHH) bekannt (Sasaki et al. 2017; Furusho et al. 2020). In der Humanmedizin spricht man von Hypertonie, wenn der systolische Blutdruck  $\geq$  140 mmHg und der diastolische  $\geq$  90 mmHg ist (World Health Organization 2019). Das American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) bezeichnet Hunde und Katzen mit einem systolischen Blutdruck unter 140 mmHg als normotensiv (Acierno et al. 2018).

Um die Auswirkungen einer inaktivierenden KLHL3 Mutation (KLHL3<sup>R528H</sup>) auf männliche Versuchsmäuse zu ermitteln, wurden die Mäuse in zwei Altersgruppen eingeteilt. In einer Gruppe erfolgt die Probenentnahme im Alter von drei Monaten, bei der zweiten Gruppe in

einem Alter von 6 Monaten. In beiden Gruppen wurden Wildtyp Mäuse (WT, KLHL3<sup>+/+</sup>), heterozygote Mäuse (HET, KLHL3<sup>R528H/+</sup>) und homozygote Knock-in Mäuse (KI, KLHL3<sup>R528H/R528H</sup>) untersucht. Die durch Gen-Knock-in induzierte Mutation führt zur Produktion eines KLHL3-Moleküls, das WNK1/WNK4 mit einer geringeren Affinität bindet (Furusho et al. 2020). Es kommt zu einem funktionellen Knock-out. Für die Untersuchung wurden Blut- und Harnanalysen, sowie histologische Schnitte der Nieren herangezogen. Die histologischen Präparate wurden in zwei verschieden Färbungen untersucht. Einerseits wurden die Präparate in der Übersichtsfärbung Hämatoxylin-Eosin (H.E.) angefärbt und zusätzlich wurden Picro-Sirius-Red-Färbungen (PSR) angefertigt. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet.

#### 1.1. Die Niere

Die wichtigste Aufgabe der Niere (Ren) ist die Ausscheidung von harnpflichtigen Substanzen, Stoffwechselabbauprodukten und Fremdstoffen, wie z.B. Medikamenten. Moleküle, die für den Körper essenziell sind, werden in den Nieren reabsorbiert oder gar nicht erst filtriert. Dazu zählen vor allem Mineralstoffe, Proteine und Glukose. Durch Reabsorption und Sekretion einiger Metaboliten in das Tubulussytem, reguliert die Niere den Wasser- und Elektrolythaushalt, sowie den Säure-Basen-Haushalt. Außerdem werden in den Nieren wichtige Hormone, wie z.B. Renin und Erythropoetin, produziert.

Die Arteria und Vena renalis sind für die Blutversorgung der Niere verantwortlich. Der produzierte Harn wird über den Harnleiter (Ureter) in die Harnblase (Vesica urinaria) abgeleitet. Arterie, Vene und Harnleiter treten über den Hilus renalis in die Niere ein bzw. aus (Engelhardt et al. 2015).

Grundsätzlich sind die Nieren links und rechts der Wirbelsäule auf Höhe der vorderen Lendenwirbel zu finden. Gesunde Nieren haben eine rötlich bis leicht bräunliche Farbe und eine bohnenförmige Gestalt, mit tierartlichen Unterschieden. Direkt am cranialen Nierenpol sind die Nebennieren (Glandulae adrenales) zu finden, welche sehr klein und an der hellrosa Farbe zu erkennen sind. Die Nebennieren sind endokrine Drüsen und produzieren lebensnotwendige Hormone. Unter anderem wird dort auch das Mineralokortikoid Aldosteron gebildet, welches wichtige Vorgänge in der Niere steuert (Engelhardt et al. 2015; Salomon et al. 2015).

#### 1.1.1. Aufbau der Niere

Das Nierengewebe ist in Lappen (Lobi renales) aufgebaut und lässt sich in eine Nierenrinde (Cortex renalis) und ein Nierenmark (Medulla renalis) unterteilen. Die Nierenlappen enden in sogenannten Nierenpapillen (Papillae renales) und leiten den Harn in das Nierenbecken (Pelvis renalis) weiter. Das Nierenbecken verjüngt sich zum Harnleiter (Ureter), welcher in der Harnblase (Vesica urinaria) endet. Aus der Harnblase wird der Harn über die Harnröhre (Urethra) abgeleitet (Engelhardt et al. 2015; Salomon et al. 2015). Eine schematische Darstellung des Aufbaus ist in Abb. 1 ersichtlich.



**Abbildung 1: Querschnitt einer Niere.** Von außen nach innen ist die Niere wie folgt aufgebaut: ganz außen, der Niere direkt anliegend befindet sich die Capsula fibrosa (6), die hellbraune Fläche stellt die Nierenrinde (2) dar, die dunkelbraunen Areale bilden das Nierenmark (1), von wo aus der Urin über die Nierenkelche (7) in das Nierenbecken (8) gelangt. Der Urin wird über den Ureter (5) aus dem Nierenbecken abtransportiert. Die Blutversorgung der Niere stellen die A. renalis (3) und die V. renalis (4) sicher. Modifiziert nach https://www.dr-gumpert.de/html/niere.html (Zugriff 01.04.2021).

Die Nieren von Vertebraten funktionieren wie ein Ultrafiltrations-Rückresorptions-System. Das bedeutet, dass unbekannte aufgenommene, potenziell toxische Substanzen ausgeschieden und nur bekannte Stoffe in der Niere reabsorbiert werden. Das Prinzip der Filtration und Rückresorption funktioniert nur aufgrund der Funktionseinheiten (Nephrone), die in die Nierenlappen eingebettet sind. Jedes Nephron besteht aus:

Glomerulus renalis (Gefäßknäuel)

Capsula glomeruli (Bowman-Kapsel)

bilden zusammen das Nierenkörperchen (Corpusculum renale)

Tubulussystem

### **Glomerulus renalis**

Der Gefäßknäuel, besteht aus glomerulären Kapillaren, liegt zwischen zwei Arteriolen (Vas afferens und Vas efferens) und wird dadurch zum regulierbaren Hochdruck-Filtrationssystem. Die Ein- bzw. Austrittsstelle der Arteriolen am Glomerulum wird auch als Gefäßpol bezeichnet. Die Glomeruli sind in der Nierenrinde lokalisiert. Im Gefäßknäuel wird Plasma filtriert und das Ultrafiltrat, der sogenannte Primärharn produziert und in die Bowman-kapsel abgegeben. Jedes Glomerulum wird von einer Bowman-Kapsel umgeben (Engelhardt et al. 2015; Salomon et al. 2015).

#### Capsula glomeruli

Die Bowman-Kapsel besteht aus einem viszeralen (inneren) und einem parietalen (äußeren) Blatt. Dazwischen befindet sich der Kapselraum. Das parietale Blatt besteht aus einem einschichtigen Plattenepithel. Das viszerale Blatt der Kapsel umgibt die Kapillaren des Gefäßknäuels und besteht aus Podozyten. Die Podozyten sind sternförmige Zellen mit Fortsätzen. Die Fortsätze der Podozyten verbinden sich und lassen zwischen sich Schlitzporen offen. Somit besteht die glomeruläre Filtrationsbarriere und Blut-Harn-Schranke aus dem fenestrierten Endothel der Kapillaren, dessen Basalmembran und den Podozyten-Schlitzporen. Diese drei Schichten verhindern, dass Stoffe mit höherem Molekulargewicht frei filtriert werden und ermöglichen kleinmolekularen Stoffen den Durchtritt. Der filtrierte Primärharn wird im Kapselraum gesammelt und von dort über den Harnpol in das Tubulussystem weitergeleitet (Engelhardt et al. 2015; Salomon et al. 2015).

### <u>Tubulussystem</u>

Das Tubulussystem (Abb. 3) schließt sich direkt der Bowman-Kapsel an und beginnt am Harnpol mit dem proximalen Tubulus. Der proximale Tubulus besteht aus einem gewundenen (Tubulus contortus proximalis) und einem geraden Teil (Tubulus rectus proximalis). Der proximale Tubulus geht in die Henle-Schleife über. Diese besteht aus einem dünnen absteigenden und aufsteigenden, sowie aus einem dicken aufsteigenden Teil. Der dicke aufsteigende Teil der Henle-Schleife ist gleichzeitig Teil des distalen geraden Tubulus (Tubulus rectus distalis), welcher in den distalen gewundenen Tubulus (Tubulus contortus distalis) übergeht. Der Tubulus rectus distalis zieht zum Glomerulum zurück und legt sich dem Gefäßpol an. Der Kontakt zwischen distalen Tubulus und Glomerulum wird als Macula densa bezeichnet (Engelhardt et al. 2015; Salomon et al. 2015).

Die Macula densa Zellen gehören wie auch die epitheloiden/juxtaglomerulären Zellen und extraglomerulären Mesangiumzellen zum juxtaglomerulären Apparat. Der juxtaglomeruläre

Apparat reguliert den renalen Elektrolythaushalt und spielt bei der Blutdruckregulation eine wichtige Rolle.

Die Macula densa Zellen liegen als Bestandteil der Wand des Tubulus rectus distalis zwischen dem Vas afferens und dem Vas efferens des Gefäßpols und stehen mit den epitheloiden Zellen in Kontakt. Die Aufgabe der Macula densa besteht darin, die Natriumionenkonzentration im Tubuluslumen zu messen. Der Natrium-Kalium-2Chlorid-Symporter dient der Macula densa dabei als Sensor. Ist beispielsweise die Natriumkonzentration im Urin erhöht, kommt es durch verschiedene Mediatoren zur Konstriktion der glatten Muskelzellen des Vas afferens und die GFR wird gesenkt. Ist die luminale Natriumkonzentration erniedrigt, werden die epitheloiden Zellen durch die Macula densa zur Reninproduktion und -freisetzung stimuliert (Engelhardt et al. 2015; Liebich 2003).



Abbildung 2: Corpusculum renale (Nierenkörperchen) und Übergang zum Tubulussystem. Im Inneren der Bowman-Kapsel (a+b) befinden sich die Kapillarschlingen. Durch die afferente Arteriole (d) fließt das Blut in die Kapillaren hinein und über die efferente Arteriole (h) wird es abtransportiert. Die Zellen der Macula densa (g) messen die Natriumkonzentration im Tubuluslumen, während die epitheloiden Zellen (d) hingegen hauptsächlich für die Reninproduktion verantwortlich sind. Die afferente und efferente Arteriole bilden den sogenannten Gefäßpol (h+d), während der Übergang von Bowman-Kapsel zum Tubulus contortus proximalis als Harnpol (c) bezeichnet wird. Die Macula densa (g) bildet zusammen mit den extraglomerulären Mesangiumzellen (f) und epitheloiden Zellen (d) den juxtaglomerulären Apparat. Modifiziert nach https://www.lecturio.de/magazin/histologie-niere/ (Zugriff 01.04.2020).

Der distale gewundene Tubulus setzt sich als kurzes Verbindungsstück (Tubulus attenuatus) fort und mündet in das Sammelrohr (Tubulus renalis colligens). Die Sammelrohre ziehen in das Nierenmark und leiten den Endharn in das Nierenbecken. Von dort aus gelangt der Urin über den Harnleiter (Ureter) in die Harnblase (Vesica urinaria) und wird schließlich über die Harnröhre (Urethra) abtransportiert (Engelhardt et al. 2015; Salomon et al. 2015).



**Abbildung 3: Das Nephron.** Schematische Darstellung der einzelnen Nephronabschnitte in Nierenrinde und - mark. Modifiziert nach Ulfig, Norbert (2011): Kurzlehrbuch Histologie. 3., überarbeitete Auflage, S. 168.

Der dicke aufsteigende Teil der Henle-Schleife besitzt keine Wasserkanäle und ist somit für Wasser impermeabel. In diesem Abschnitt werden aber Ionen durch den Natrium-Kalium-2Chlorid-Symporter (siehe Abb. 4) in die Zellen aufgenommen. Der Natrium-Kalium-2Chlorid-Symportert ist für die Resorption von 25-30 % der filtrierten Natrium- und Chloridmenge verantwortlich. In der apikalen (luminalen) Membran des Tubulus contortus distalis befindet sich der Natrium-Chlorid-Cotransporter (NCC) (siehe Abb. 4), welcher ca. 10 % der filtrierten

Natrium- und Chloridmenge wieder reabsorbiert. Später im Konvolut des distalen Tubulus und in den Sammelrohren befinden sich epitheliale Natriumkanäle (ENaC) und apikal gelegene Kaliumkanäle, die sogenannten renal outer medullary potassium channels (ROMK), deren Einbau von Aldosteron gesteuert wird (siehe Abb. 4). Aldosteron ist ein Mineralokortokoid, das in der Nebennierenrinde produziert wird und an den intrazellulären Mineralokortikoidrezeptor bindet. Durch die Aktivierung der Transkription von Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase 1 (SGK1) bewirkt Aldosteron eine vermehrte Oberflächenexpression und Aktivität von ENaC, welche für die Feinregulation des Natriumhaushaltes zuständig sind. Zusätzlich steigert Aldosteron die Expression der basolateralen Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase (ATP), um die transepitheliale Potentialdifferenz aufrechtzuerhalten. Aldosteron führt so zu einer vermehrten Natriumreabsorption und als Folge der transepithelialen Potentialdifferenz kommt es zu einer vermehrten Kaliumsekretion über die ROMK (Valinsky et al. 2018). Durch die Aktivierung der Natrium-Kalium-ATPase wird vermehrt Natrium aufgenommen und basolateral entsteht ein positives epitheliales Potential, das zu einer gesteigerten Kaliumausscheidung führt. Die Reabsorption des sezernierten Kaliums funktioniert über ATP-abhängige Protonen-Kalium-Pumpen. Dabei werden Wasserstoffionen aus der Zelle hinaus und Kaliumionen in die Zelle hineingeschleust (Engelhardt et al. 2015).

Die proximalen Abschnitte der Sammelrohre sind für Harnstoff undurchlässig und wichtig für die Konzentrierung des Endharns. In diesen Abschnitten wird Wasser reabsorbiert. In den späten Abschnitten des distalen Tubulus und in den Sammelrohren kann durch den Einbau von Wasserkanälen (Aquaporinen) Wasser reabsorbiert werden. Der Einbau wird durch das anti-diuretische Hormon (ADH) gesteuert. Je mehr ADH ausgeschüttet wird, desto mehr Wasserkanäle werden eingebaut. ADH wird im Hypothalamus produziert und in der Neurohypophyse, dem Hypophysenhinterlappen, gespeichert und ins Blut abgegeben. Die Freisetzung von ADH wird unter anderem durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) gesteuert. Zusammen mit Aldosteron reguliert ADH den Wasserhaushalt des Körpers (Engelhardt et al. 2015).



Abbildung 4: Ionentransporter im Tubulussystem. Schematische Darstellung der wichtigsten Ionentransporter für Natrium und Kalium im Tubulussystem der Niere. Aus Engelhardt et al. 2015, S. 309.

### 1.1.2. Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Wie bereits oben erwähnt (siehe Abb. 2) wird Renin, ein Enzym, von den epitheloiden Zellen des juxtaglomerulären Apparates produziert und freigesetzt. Durch die Reninfreisetzung wird das RAAS aktiviert. Neben einem Natriummangel führen auch Hypotension, Hypovolämie, vermindertes Schlagvolumen des Herzens und eine gesteigerte Aktivität des sympathischen Nervensystems zu einer gesteigerten Reninproduktion und -freisetzung. Renin wandelt das von der Leber produzierte Protein Angiotensinogen in das Prohormon Angiotensin I (AT I) um. AT I wird von dem Angiotensin-konvertierenden Enzym (ACE), welches hauptsächlich auf den

Endothelzellen der Lunge exprimiert wird, in das aktive Hormon Angiotensin II (AT II) umgewandelt. AT II steigert die Ausschüttung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde, fördert die ADH-Sekretion und führt zu Vasokonstriktion, auch an der efferenten Nierenarteriole. Zusätzlich erhöht AT II das Durstgefühl und den Salzappetit (Ames et al. 2019).

#### 1.1.3. Natrium-Chlorid-Cotransporter (NCC)

Der NCC befindet sich am Anfang des Tubulus contortus distalis. Die Aktivierung des Transporters kann über verschiedene Signalkaskaden erfolgen. Die Ausschüttung von Aldosteron, Blutdruckabfall, eine niedrige intrazelluläre Chloridkonzentration in den Zellen des Tubulus contortus distalis und eine Hypokaliämie sind die wichtigsten Signale, die zur Aktivierung des NCC führen.

Aldosteron bewirkt eine vermehrte tubuläre Reabsorption von Natrium über den NCC (Valinsky et al. 2018). Eine erniedrigte extrazelluläre Kaliumkonzentration aktiviert den Transporter über die Phosphorylierung der With-No-Lysin-Kinase 1 und 4 (WNK) (Furusho et al. 2020). Die Aktivierung des NCC über WNK1 und WNK4 erfolgt durch Phosphorylierung. WNK1 und WNK4 aktivieren die oxidative stress-responsive gene 1 (OSR1)/Ste20-related proline– alanine-rich kinase (SPAK) und bilden die sogenannte WNK–OSR1/SPAK–NCC Phosphorylierungskaskade.

Liegt eine erniedrigte Kaliumkonzentration im Blut vor, wird an der zellulären Membran der Zellen des Tubulus contortus distalis mehr Kalium über die nach innen gerichteten Kaliumkanäle 4.1/5.1 (KIR) ins Blut abgegeben. Dadurch kommt es im Zellinneren zu einer Hyperpolarisation. Durch die Hyperpolarisation wird das negativ geladene Chlorid über basolateral in das Blut abgegeben, um ein weiteres Absinken des Potentials im Zellinneren zu verhindern. Der sofortige Abtransport von Chlorid führt zu einer erniedrigten Chloridkonzentration in den Tubuluszellen und dadurch zur Aktivierung der WNK–OSR1/SPAK–NCC Phosphorylierungskaskade (Furusho et al. 2020).

Shibata et al. haben in ihren Versuchen bestätigt, dass auch AT II die Aktivität des NCC steigert. AT II induziert die Protein Kinase C-abhängige Phosphorylierung von Kelch-like Protein 3 (KLHL3) und verhindert damit den Abbau von WNK4. Die WNK–OSR1/SPAK–NCC Phosphorylierungskaskade wird gestartet und NCC aktiviert (Shibata et al. 2014).

Die gesteigerte Aufnahme von Natrium und Chlorid führt auch zu einer erhöhten Reabsorption von Wasser über die Aquaporine des distalen Tubulus und Sammelrohres. Das Waser folgt dem osmotischen Gradienten und strömt in das hyperosmolare Interstitium. Es kommt zu einer Erhöhung des Blutvolumens und in weiterer Folge zu Hypertension (Furusho et al. 2020).

#### 1.1.4. Wirkung von Kelch-like Protein 3 (KLHL3) in der Niere

KLHL3 ist ein Protein, das zur Familie der BTB-BACK-Kelch Familie gehört und mit dem Cullin 3 Protein (CUL3) den KLHL3-CUL3-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex bildet. Dieser Komplex markiert das in den Zellen des distalen Tubulus produzierte WNK1 und WNK4 zum Abbau. Die R528H-Mutation im KLHL3 Protein verhindert eine adäquate Inaktivierung und einen vollständigen Abbau der WNK 1 und WNK 4 Proteine, dadurch wird der NCC nicht dephosphoryliert (Sasaki et al. 2017). Die Transporter bleiben aktiv und es wird vermehrt Natrium und Chlorid in die Tubuluszellen aufgenommen. Durch die gesteigerte Natriumaufnahme über den NCC, wird weniger Natrium über ENaC im distalen Tubulus und Sammelrohr reabsorbiert und dadurch auch weniger Kalium über die ROMK sezerniert. Es kommt neben der Erhöhung des Blutvolumens zu einer Hyperkaliämie. Die geringere Menge an sezernierten Kaliumionen hat zur Folge, dass über die Protonen-Kalium-Pumpe weniger Kalium aufgenommen wird und mehr Wasserstoffionen in den Tubuluszellen bleiben. Dies führt dazu, dass weniger Wasserstoffionen renal sezerniert werden und der pH-Wert im Blut sinkt. Sinkt der pH-Wert im Blut unter 7,35 liegt eine Azidose vor (Engelhardt et al. 2015; Furusho et al. 2020).

### 1.2. Hypertonie

In der Humanmedizin spricht man von Hypertonie, wenn der systolische Blutdruck ≥ 140 mmHg und der diastolische ≥ 90 mmHg ist (World Health Organization 2019). Das American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) bezeichnet Hunde und Katzen mit einem systolischen Blutdruck unter 140 mmHg als normotensiv (Acierno et al. 2018). Der Blutdruck wird als das Produkt aus Herzminutenvolumen (HMV) und totalen peripheren Widerstand (TPR) definiert (Padmanabhan et al. 2009). Man unterscheidet die primäre und die sekundäre Hypertonie voneinander. Die primäre Hypertonie ist bei Erwachsenen die häufigste Form und wird als Bluthochdruck ohne erkennbare Ursache definiert. Die sekundäre Hypertonie tritt als Folge einer zuvor ausgebildeten Grunderkrankung, wie z.B. Hyperthyreose oder Nierenerkrankungen, auf (DocCheck Medical Services GmbH 15.09.2020). Hypertonie ist eine komplexe multifaktorielle Erkrankung, die sowohl durch genetische Mutationen als auch durch Umwelteinflüsse verursacht und beeinflusst werden kann. Es wird angenommen, dass vor allem kaliumarme Diäten, zu hoher Salzkonsum, eine Hyperaktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und genetische Prädispositionen bei Menschen zu Bluthochdruck führen können (Leong et al. 2015).

Auch Mutationen der Enzyme WNK1, WNK4, CUL3 oder KLHL3 können zu der mit salzsensitiver Hypertonie assoziierten Erkrankung Pseudohypoaldosteronismus Typ 2 (PHA2) führen. PHA2 ist auch als Gordon-Syndrom oder familiäre hyperkaliämische Hypertonie (FHH) bekannt (Furusho et al. 2020; Sasaki et al. 2017).

Furusho et al. hat beschrieben, dass Individuen mit Mutationen des CUL3 Proteins das schwerste Krankheitsbild des PHA2 zeigen. Die meisten Patienten entwickeln bereits vor dem 18. Lebensjahr Bluthochdruck. CUL3 Mutationen führen nicht nur zu gesteigerter renaler Salzretention, sondern beeinflussen auch die Kontraktilität der arteriellen Blutgefäße (Furusho et al. 2020). Es hat sich gezeigt, dass diese Patienten zusätzlich eine erhöhte Konzentration an RhoA aufweisen, ein Molekül, das für die Kontraktilität der Gefäße verantwortlich ist. RhoA phosphoryliert das Motorprotein Myosin in den Myozyten, dadurch kann Myosin an Aktin binden und es kommt zu einer Kontraktion. Bei gesunden Individuen wird RhoA von CUL3 ubiquitiert und dadurch abgebaut. Ist das CUL3 Protein von Mutationen betroffen, findet kein adäguater RhoA-Abbau statt und die RhoA-Konzentration in den Muskelzellen steigt. Der Gefäßtonus wird gesteigert, wodurch die Gefäßwände versteift werden. Es kommt zu einer Vasokonstriktion und zu einem Blutdruckanstieg (Abdel Khalek et al. 2019; Furusho et al. 2020). Mutationen des KLHL3 Proteins können auch zu schweren Formen des PHA2 führen, verlaufen in der Regel aber trotzdem milder als CUL3 Mutationen. Patienten mit WNK1/WNK4 Mutationen sind hingegen am wenigsten betroffen und zeigen die am wenigsten schwere Form des Gordon-Syndroms. Sie entwickeln typsicherweise zwischen Anfang und Mitte dreißig Hypertonie (Furusho et al. 2020).

In der Humanmedizin weiß man, dass Bluthochdruck eine der häufigsten Ursachen für die Entwicklung anderer kardiovaskulärer Erkrankungen, wie z.B. koronare Herzkrankheit, Vorhofflimmern, systolische Herzinsuffizienz und chronische Nierenerkrankungen ist (Tackling and Borhade 2022). Acierno et al. haben 2018 im Journal of Veterinary Internal Medicine veröffentlicht, dass es zu Hypertension bei Hunden und Katzen keine Prävalenz-Daten gibt (Acierno et al. 2018).

### 1.3. Fragestellung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob heterozygote und homozygote Mäuse mit einer R528H-Mutation im KLHL3-Protein auf genetischem C57BL/6 Hintergrund und Normaldiät das Krankheitsbild eines Pseudohypoaldosteronismus Typ 2 entwickeln. Ein Ziel war auch herauszufinden, ob die Versuchstiere mit fortschreitendem Alter eine eingeschränkte Nierenfunktion bzw. eine veränderte Nierenmorphologie entwickeln.

# 2. Material und Methoden

### 2.1. Versuchstiere

Für den Versuch wurden insgesamt 48 männliche Mäuse auf genetischem C57BL/6 Hintergrund verwendet. Die Tiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt. In der ersten Gruppe erfolgte die Probenentnahme im Alter von drei Monaten und in der zweiten Gruppe im Alter von sechs Monaten. In beiden Gruppen wurden Wildtyp Mäuse (WT, KLHL3<sup>+/+</sup>), heterozygote Mäuse (HET, KLHL3<sup>R528H/+</sup>) und homozygote Knock-in Mäuse (KI, KLHL3<sup>R528H/R528H</sup>) untersucht. Die R528H-Mutation führt zur Produktion eines KLHL3-Moleküls, welches WNK1/WNK4 mit einer geringeren Affinität bindet. Es kommt zu einem funktionellen Knockout.

Die Mäuse wurden in Gruppen und bei einem zwölf Stunden Tag-/ zwölf Stunden Nachtrhythmus gehalten. Alle Tiere hatten ständigen Zugang zu Wasser und Futter. Es wurde eine Standardnagerdiät mit einem Natriumgehalt von 1 % gefüttert.

Die Tierversuche wurden an der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführt und waren vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung genehmigt (BMWFW-68.205/0001-WF/V/3b/2017).

### 2.2. Probengewinnung, -aufbereitung & -analyse

Drei Tage vor der Sektion wurde über einen Zeitraum von zwölf Stunden Urin in einem Stoffwechselkäfig gewonnen. Dazu wurde jedes Tier in einen eigenen Käfig mit Zugang zu Wasser gesetzt. Der in ml gesammelte Urin wurde anschließend mit einem Cobas-Autoanalyser (Cobas c 111, Roche Diagnostics GmbH, Österreich) analysiert und das Gesamtvolumen in µl bestimmt. Für die Analyse wurden 90 µl Urin und 10 µl 0,5 molare Salzsäure in ein Cobas-Probenröhrchen gegeben. Das Verhältnis von Urinprobe zu Säure wurde mittels einer vorher durchgeführten Testreihe bestimmt.

Nach den labordiagnostischen Messungen wurden für alle Versuchsmäuse die fraktionelle Exkretion der Elektrolyte (FE\_x) und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) berechnet.

Die GFR wurde wie folgt berechnet:

$$\mathbf{GFR} = \frac{(\text{Crea Urin * U.Vol.})}{(\text{Crea Serum*720})} *1000$$

... Crea Urin: Kreatininkonzentration im Urin in mmol/I

... Crea Serum: Kreatininkonzentration im Serum µmol/I

... U.Vol.: Urinvolumen in µl

... 720 Minuten: es wurde über 12 Stunden der Urin der Mäuse gesammelt

Die GFR wird verwendet, um die Funktionsfähigkeit der Niere abzuschätzen. Dazu wird die Konzentration von Kreatinin in Blut und Urin gemessen. Kreatinin wird über die Glomeruli der Niere filtriert und weder im Tubulussystem sezerniert noch reabsorbiert. Steigt die Kreatininkonzentration im Blut an, ist das unter Umständen ein Hinweis darauf, dass die Nieren nicht mehr adäquat funktionieren. Die Kreatinikonzentration im Blut steigt aber erst an, wenn ca. 75 % der Nieren nicht mehr ordnungsgemäß filtrieren.

Für die fraktionelle Exkretion der einzelnen Elektrolyte wurde folgende Formel benutzt:

**FE\_x**= 
$$\frac{(\text{Konz. x Urin*Crea Serum})}{(\text{Konz. x Serum*Crea Urin})}$$
\*100/1000

- ...Konz. x Urin: Konzentration des Elektrolyten x im Urin in mmol/I
- ... Konz. x Serum: Konzentration des Elektrolyten x im Serum mmol/I
- ... Crea Serum: Kreatininkonzentration im Serum µmol/I
- ... Crea Urin: Kreatininkonzentration im Urin in mmol/I

Am Ende der Versuchsdauer wurden alle Mäuse nochmals gewogen und das aktuelle Körpergewicht dokumentiert. Die Tiere wurden mit einer Überdosis eines Ketamin/Medetomidin-Gemisch (67/7 mg/kg intraperitoneal) anästhesiert und durch Blutentzug aus der Vena cava caudalis mittels einer 1 ml Einwegspritze und 23G Nadel

getötet. Das Blut wurde von der Spritze in ein passendes Eppendorf Tube (Eppendorf Tubes®, Eppendorf AG, Deutschland) umgefüllt und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Eppendorf Tubes wurden für drei Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (6000 Umdrehungen/Minute bei Eppendorf-Zentrifuge 5427R 230V/50-60 Hz inklusive Rotor FA-45-48-11). Je nach geplanter Analyse wurden zwischen 25 µl und 105 µl Serum in beschriftete Eppendorf Tubes pipettiert und bei - 80°C eingefroren, bis die Messungen mit dem Cobas erfolgten. Für die Messungen wurden 105 µl Serum in die Cobas-Probenröhrchen gegeben.

Die Messergebnisse von Urin und Serum, sowie die errechneten Werte für die fraktionelle Elektrolytexkretion und GFR, wurden in das Softwareprogramm Graphpad Prism 8 übertragen und statistisch ausgewertet.

Das Herz und die Nieren wurden den Versuchsmäusen entnommen, das Organgewicht bestimmt und dokumentiert. Die Nieren wurden aus der Bindegewebskapsel befreit, der Hilus entfernt und jede Niere durch einen Medianschnitt geteilt. Anschließend wurde das Herz und jede Nierenhälfte in ein separates Histo-Körbchen gelegt und in 4 %-igem Paraformaldehyd (PFA) bei 4°C für 24 Stunden fixiert. Nach der Fixierung wurden alle Körbchen für insgesamt 48 Stunden in 0,1 molaren Phosphatpuffer mit Sucrose (siehe Tabelle 1) eingelegt. Nach 24 Stunden wurde der Puffer ausgetauscht und die Organe in einen frischen Puffer eingelegt, um die PFA-Reste auszuwaschen. Der pH-Wert des Puffers wurde auf 7,38 eingestellt.

Chemikalien	Menge in Gramm
Sucrose	200
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	5,44
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) x 2H <sub>2</sub> O	28,48

Tabelle 1: Anleitung zur Herstellung von 2 L 0,1 molaren Phosphatpuffer mit Sucrose

## 2.2.1. Histologische Aufbereitung der Organe

Die fixierten Nieren wurden in 70 %-igem Ethanol eingelegt, bevor sie in der Histokinette (Shandon<sup>™</sup> Excelsior<sup>™</sup> ES Gewebeeinbettautomat, Fisher Scientific GmbH, Deutschland)

mittels aufsteigender Alkoholreihe infiltriert wurden (siehe Tabelle 2). Die Nieren wurden danach mit der Schnittfläche nach unten in Paraffin eingebettet. Die ausgekühlten Paraffinblöcke wurden mit einem Rotationsmikrotom (HM 355s, Einmalklinge, Fisher Scientific GmbH, Deutschland) 5 µm dick geschnitten. Die Schnitte wurden zuerst in Raumtemperatur warmes deionisiertes Wasser gelegt und anschließend in ein warmes Wasserbad überführt. Nach der vollständigen Streckung der Paraffinschnitte im warmen Wasser wurden je zwei Schnitte auf einen 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) behandelten Objektträger (siehe Tabelle 3) aufgezogen. Die APES-Behandlung dient der besseren Haftung der Schnitte auf den Objektträgern. Die Schnitte wurden für mindestens drei Tage in einem Wärmeschrank bei 40 °C getrocknet.

Substanzen	Zeit in Stunden	Temperatur in °C
Ethanol 75 %	01:00	
Ethanol 90 %	02:00	
Ethanol 95 %	02:00	
Isopropanol I	01:00	
Isopropanol II	00:30	- 25
Isopropanol III	00:30	
Xylol I	02:00	
Xylol II	02:00	
Xylol III	01:00	
Paraffin I	01:30	7
Paraffin II	01:30	54
Paraffin III	01:30	

**Tabelle 2: Protokoll Histokinette** 

Substanzen	Dauer	
Aceton I	10 Min.	
Leitungswasser	spülen	
Aceton II	5 Min.	
APES-Lösung	5 Min.	
destilliertes Wasser	spülen	
destilliertes Wasser	5 Min.	
Objektträger lufttrocknen oder bei 40-50	0 °C im Umluft-Wärmeschrank trocknen	
APES-Lösung		
<ul> <li>3-Aminopropyl-triethoxy-silan (Sigma.Nr. A 3648)</li> </ul>	5 ml	
<ul> <li>∧ Aceton</li> </ul>	200 ml	

Tabelle 3: Protokoll zur Herstellung von APES beschichteten Objektträger

## 2.3. Histologische Färbungen

Insgesamt wurden sechs Mäuse aus jeder Versuchsgruppe nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und jeweils ein Objektträger in Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.) und einer in Picro-Sirius-Red-Färbung (PSR) angefertigt. Bevor die Schnitte gefärbt wurden, wurden sie mittels einer absteigenden Alkoholreihe entparaffinert (siehe Tabelle 4 und 5). Für die Entparaffinierung, sowie die Färbung, benötigt man Glasküvetten und Glaskörbchen.

### 2.3.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die H.E.-Färbung dient als Übersichtsfärbung und färbt negativ geladene Strukturen, wie z.B. Zellkerne, blau und positiv geladene Strukturen, wie z.B. Zytoplasma, rosarot bis rot an. Mikroskopisch wurde der physiologische Aufbau der Nieren und die Strukturen im Nierenparenchym untersucht.

Entparaffinieren	Xylol I	15 Min.		
	Xylol II	15 Min.		
	Isopropanol	5 Min.		
	70 % Ethanol	5 Min.		
	40 % Ethanol	5 Min.		
	destilliertes Wasser	5 Min.		
Färbung	Mayer Hämatoxylin	3-4 Min.		
	fließendes Leitungswasser	10 Min.		
	1 % wässriges Eosin gelblich 2-5 Min.			
	(auf 200 ml 2 Tropfen Eisessig zugeben)			
	70 % EtOH	2-3 x dippen		
	96 % EtOH	3 Min.		
	Isopropanol 5 Min.			
	Xylol	5 Min.		
Eindecken	mit DePex			

Tabelle 4: Protokoll für die H.E.-Färbung

## 2.3.2. Picro-Sirius-Red-Färbung

Die PSR-Färbung ist eine Spezialfärbung für den Nachweis von Kollagen-Typ I und Typ III. Das Kollagen färbt sich rot an, während das Zytoplasma und andere Zellstrukturen gelb dargestellt werden. Diese Färbung wird zur Darstellung und Quantifizierung des Kollagenanteils verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Softwareprogramm Image J.

Entparaffinieren	Xylol I	15 Min.		
	Xylol II	15 Min.		
	Isopropanol	5 Min.		
	70 % Ethanol	5 Min.		
	40 % Ethanol	5 Min.		
	destilliertes Wasser	2,5 Min.		
	destilliertes Wasser	2,5 Min.		
Färbung	Picro-Sirius-Red Solution	90 Min.		
(lichtgeschützt)				
Waschschritte	Acidified Water I (lichtgeschützt)	3 Min.		
	Acidified Water II (lichtgeschützt)	3 Min.		
	Isopropanol I	3 Min.		
	Isopropanol II	3 Min.		
	Xylol I	7 Min.		
	Xylol II	7 Min.		
Eindecken	mit Depex			
	⇔ anschließend mit Alufolie abdecken (	wegen Polarisation)		
Picro-Sirius-Red	0,5 g Sirius RedF3B			
Solution	500 ml Pikrinsäure-Solution 1,3 %			
Acidified Water	1 L destilliertes Wasser			
	0,83 ml konzentrierte Salzsäure (HCl) 37 %			

Tabelle 5: Protokoll für die PSR-Färbung

# 2.4. Mikroskopische Auswertung der Schnitte

Die gefärbten Schnitte wurden mit einem Mikroskop (Axioskop, Zeiss, Deutschland), das mit einer 3-Megapixel-Mikroskopkamera (Axiocam 503 color, Zeiss, Deutschland) ausgestattet war, mikroskopiert und ausgewertet.

Mit dem ZEN Programm (ZEISS ZEN-Digital Imaging für Lichtmikroskopie, Zeiss, Deutschland) wurden jeweils vier Bilder der Nierenrinde pro Versuchsmaus angefertigt. Dazu wurden die Rindenabschnitte der PSR gefärbten Nieren in vier gleich große Quadranten

unterteilt. Das Mikroskop und das ZEN Programm wurden immer unter den gleichen Aufnahmeeinstellungen verwendet.

Im Anschluss wurden die Bilder mit dem Softwareprogramm Image J mit Hilfe von semiautomatischen Macros ausgewertet. Die Ergebnisse wurden in das Softwareprogramm Graphpad Prism 8 übertragen und statistisch ausgewertet.

#### 2.5. Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden mit dem Softwareprogram Graphpad Prism 8 (Dotmatics, Boston) durchgeführt. Für die Signifikanzüberprüfung wurde die One-way ANOVA-Analyse verwendet. Daran anschließend wurde ein multipler Vergleich angestellt, um alle Werte von allen Gruppen untereinander zu vergleichen. Als post-hoc-Test wurde der Tukey Test eingesetzt. Der Tukey Test ist ein multipler Vergleichstest und wird zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden zwischen den Mittelwerten einzelner Gruppen im Zuge der Varianzanalyse eingesetzt (StatSoft Europe 2002).

Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wurde als signifikant angesehen. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wird mit \*, ein p  $\leq 0,01$  mit \*\* und ein p  $\leq 0,001$  mit \*\*\* gekennzeichnet.

Zur Darstellung der Diagramme wurden immer die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe, sowie die Standardabweichung oder der Standardfehler verwendet.

# 3. Ergebnisse

#### 3.1. Urin- und Serumanalytik

Die Urinanalyse verschafft einen ersten Überblick über die Funktionsfähigkeit der Nieren. Die Urinmenge und das Vorhandensein von harnpflichtigen Substanzen im Urin, wie Harnstoff und Kreatinin, geben Auskunft über die glomeruläre Filtrationsrate der Nieren. Eine eingeschränkte Nierenfunktion führt häufig zu einem Verlust der Konzentrierungsfähigkeit und einem Anstieg des Urinvolumens. Das Urinvolumen und die Konzentration der im Harn gelösten Substanzen, sowie die Harnkonzentration selbst sind stark von der Wasseraufnahme abhängig. Um volumenunabhängige Elektrolytwerte zu erhalten, wurden die Konzentrationen der ausgeschiedenen Elektrolyte auf Kreatinin korrigiert. Kreatinin entsteht im Muskelstoffwechsel und wird konstant in das Plasma abgegeben und kontinuierlich über die Niere ausgeschieden. Es wird über die Nieren frei filtriert und weder sezerniert noch reabsorbiert. Infolgedessen gibt die Kreatininkonzentration im Urin Auskunft über die Harnkonzentration. Bei einer chronischen Nierenerkrankung kommt es durch den Untergang der Glomeruli zu einer Reduktion der GFR und dadurch zu einem Anstieg der harnpflichtigen Substanzen im Blut.

In den Tabellen 6 und 7 und der Abbildung 5 werden die Ergebnisse der Serum- und Harnanalytik, sowie die fraktionelle Exkretion für die einzelnen Elektrolyte Kalium, Natrium, Kalzium, Chlorid und Phosphor gezeigt.

Abb. 5A zeigt, dass der Kaliumgehalt im Serum mit einem p-Wert von < 0,05 einen signifikanten Unterschied zwischen den dreimonatigen WT und HET Tieren, sowie zwischen den dreimonatigen WT und KI Tieren aufweist. Der Vergleich zwischen der sechs Monate alten WT und KI Gruppe ist mit einem p-Wert von < 0,05 ebenfalls signifikant. Die Abb. 5B – Kalium im Urin und 5C – fraktionelle Kaliumexkretion weisen hingegen keine signifikanten Unterschiede auf.

In Abb. 5E ist das Verhältnis von Natrium zu Kreatinin im Urin abgebildet. In dieser Grafik ist der signifikante Unterschied zwischen den drei Monate alten und sechs Monate alten Tieren der WT Gruppen mit einem p-Wert <°0,05 ersichtlich. In der Abb. 5D – Natrium im Serum, sowie in der Abb. 5F – fraktionelle Natriumexkretion konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Das Verhältnis von Kalzium zu Kreatinin im Urin, dargestellt in der Abb. 5H, zeigt deutlich unterschiedlich hohe Kalziumgehalte zwischen der drei Monate alten WT und HET Gruppe. Der p-Wert ist mit < 0,01 signifikant. In den Gruppen der sechs Monate alten Tiere wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied des Kalziumspiegels im Urin zwischen der WT und KI Gruppe festgestellt. Der Vergleich ergibt einen p-Wert von < 0,01. Der Kalziumgehalt im Serum ist bei allen Versuchsgruppen annähernd gleich und nicht signifikant unterschiedlich, ersichtlich in Abb. 5G – Kalzium im Serum.

In der Abb. 5J ist ersichtlich, dass die Gruppe der sechs Monate alten WT Tiere, verglichen mit den HET und KI Mäusen der gleichen Altersgruppe eine signifikant niedrigere Chloridkonzentration im Serum aufweist. Die Differenz zwischen den sechsmonatigen Mäusen aus der WT und HET Gruppe ist mit einem p-Wert von < 0,01 signifikant. Auch der p-Wert aus dem Vergleich von den sechs Monate alten WT mit den KI Tieren ist mit < 0,01 signifikant. Keine signifikanten Unterschiede ergeben hingegen die Messungen der Chlorid-Konzentration im Urin und der fraktionellen Chloridexkretion, ersichtlich in Abb. 5K und L.

In der Abb. 5N ist zu erkennen, dass die Differenz des Phosphor-Kreatinin-Verhältnisses im Urin zwischen der dreimonatigen und sechsmonatigen WT Gruppe mit einem p-Wert von < 0,01 signifikant unterschiedlich ist. Phosphor im Serum und die fraktionelle Phosphorexkretion ist nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 5M und O).

		3 Monate			6 Monate	
mmol/l	<b>WT</b>	<b>HET</b>	<b>KI</b>	<b>WT</b>	<b>HET</b>	<b>KI</b>
	(n = 11 - 12)	(n = 10-12)	(1 = 8-11)	(n = 11 - 12)	(n = 10-12)	(1 = 8-11)
Kalium	5,21	6,25	6,24	5,50	6,34	6,77
Nalium	+/- 0,18	+/- 0,27	+/- 0,26	+/- 0,20	+/- 0,22	+/- 0,24
Notrium	144,60	145,04	145,29	144,62	144,93	144,89
Induluiti	+/- 0,79	+/- 1,02	+/- 1,19	+/- 0,54	+/- 0,74	+/- 0,56
Kalzium	2,48	2,45	2,41	2,34	2,34	2,39
Naiziuiii	+/- 0,03	+/- 0,06	+/- 0,03	+/- 0,04	+/- 0,06	+/- 0,04
Chlorid	111,07	113,55	112,96	111,04	114,48	114,32
Chiona	+/- 0,77	+/- 0,59	+/- 1,02	+/- 0,49	+/- 0,33	+/- 0,67
Phosphor	4,13	3,65	3,77	3,33	3,35	3,53
FILOSPHOL	+/- 0,25	+/- 0,17	+/- 0,10	+/- 0,17	+/- 0,17	+/- 0,13

 Tabelle 6: Serumparameter - Angabe von Mittelwert und Standardfehler

	3 Monate alte Versuchsgruppe		6 Mor	ate alte Versuchs	gruppe	
	<b>WT</b>	<b>HET</b>	<b>KI</b>	<b>WT</b>	<b>HET</b>	<b>KI</b>
	(n = 10-14)	(n = 10-12)	(n = 10-12)	( <i>n</i> = 10-14)	(n = 10-12)	(n = 10-12)
Urinvolumen in	1677,50	1781,55	1536,50	1115,50	1651,25	1255,42
μl	+/- 200,20	+/- 93,49	+/- <i>190,01</i>	+/- <i>180</i> ,36	+/- 234,57	+/- 355,10
Normiert auf Kreatinin						
Kalium	62,36	69,57	63,63	60,61	67,71	72,34
	+/- 2,65	+/- 3,83	+/- 2,21	+/- 3,25	+/- 3,67	+/- 2,75
Natrium	132,92	93,11	107,99	61,37	92,64	75,32
	+/- 22,38	+/- 9,73	+/- 22,09	+/- <i>13,32</i>	+/- 11,86	+/- 11,90
Kalzium	0,43	0,72	0,73	0,48	0,73	0,89
	+/- 0,05	+/- 0,06	+/- 0,11	+/- 0,05	+/- 0,05	+/- 0,04
Chlorid	66,96	80,24	73,79	58,87	69,91	74,18
	+/- 3,20	+/- 4,21	+/- 3,27	+/- 4,12	+/- 2,80	+/- <i>5,1</i> 6
Phosphor	21,94	15,60	16,11	13,63	14,66	11,88
	+/- <i>1</i> ,67	+/- <i>1,21</i>	+/- <i>1,5</i> 7	+/- 2,03	+/- <i>1,8</i> 9	+/- <i>1</i> ,52
GFR in	17,37	19,86	19,21	13,28	16,55	11,85
μl/Minute/g	+/- <i>1,</i> 87	+/- 2,10	+/- 2,50	+/- 1,61	+/- 2,27	+/- 3,01
FE_x in %						
Kalium	11,50	10,02	8,36	10,92	9,73	9,90
	+/- <i>0</i> ,66	+/- 1,35	+/- 0,74	+/- 0,37	+/- 1,10	+/- 0,72
Natrium	0,78	0,58	0,59	0,44	0,54	0,46
	+/- <i>0,18</i>	+/- 0,10	+/- 0,10	+/-	+/-	+/-
Kalzium	0,17	0,27	0,26	0,22	0,28	0,34
	+/- 0,02	+/- 0,03	+/- 0,05	+/- 0,02	+/- 0,03	+/- 0,02
Chlorid	0,61	0,65	0,57	0,59	0,58	0,60
	+/- 0,04	+/- 0,06	+/- 0,05	+/- 0,04	+/- 0,05	+/- 0,06
Phosphor	5,10	3,94	3,49	4,12	3,81	3,08
	+/- 0,52	+/- 0,80	+/- 0,45	+/- 0,80	+/- 0,47	+/- 0,41

 Tabelle 7: Urinparameter - Angabe von Mittelwert und Standardfehler



Abbildung 5: Serum-, Uringehalt und fraktionelle Exkretion der Elektrolyte Kalium, Natrium, Kalzium, Chlorid und Phosphor. In der Grafik werden die Ergebnisse der fünf Elektrolyte vergleichend dargestellt. In der linken Spalte sind die Serumkonzentrationen, in der Mitte der Elektrolytgehalt im Urin normiert auf Kreatinin und in der rechten Spalte ist die fraktionelle Exkretion in Prozent abgebildet. Die grauen Balken kodieren die Tiere aus der drei Monate alten und die weißen Balken die Tiere aus der sechs Monate alten Versuchsgruppe. \* p < 0,05. \*\* p°<°0,01. \*\*\* p < 0,001. n = 8-14. Angabe von Mittelwert und Standardfehler.

26

In Abb. 6A ist das durchschnittliche Urinvolumen der unterschiedlichen Versuchsgruppen dargestellt. Es gibt keine signifikanten Unterscheide zwischen den Mausgruppen. In der Abb. 6B ist die GFR der einzelnen Gruppen abgebildet. Auch hier sind keine signifikanten Unterschiede ersichtlich.



**Abbildung 6: Urinvolumen und glomeruläre Filtrationsrate.** Die grauen Balken kodieren die Tiere aus der drei Monate alten und die weißen Balken die Tiere aus der sechs Monate alten Versuchsgruppe. n = 8-14. Angabe von Mittelwert und Standardfehler.

## 3.2. Körpergewicht und Verhältnis von Herzgewicht (HG) zu Körpergewicht (KG)

Die Abb. 7A zeigt das durchschnittliche Körpergewicht der einzelnen Mäusegruppen. Nur der Unterschied zwischen der sechs Monate alten WT und KI Gruppe ist mit einem p-Wert von < 0,05 signifikant.

In der nachstehenden Abbildung (Abb. 7B) ist ersichtlich, dass die Verhältnisse von Herz- zu Körpergewicht in den Versuchsgruppen nahezu ident sind und keine signifikanten Unterschiede aufweisen.

	3 Monate					
	<b>WT</b>	<b>HET</b>	<b>KI</b>	<b>WT</b>	<b>HET</b>	<b>KI</b>
	(n = 10-14)	(n = 10-12)	(n = 10-12)	(n = 10-14)	(n = 10-12)	(n = 10-12)
KG in g	28,79	27,15	26,27	33,60	31,10	30,24
	+/- 0,34	+/- 0,53	+/- 0,56	+/- 1,33	+/- 0,76	+/- 0,89
HG/KG in mg/g	4,08	4,27	4,20	3,80	4,04	4,27
	+/- 0,10	+/- 0,10	+/- 0,10	+/- 0,10	+/- 0,16	+/- 0,12

 Tabelle 68: Körpergewicht und Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht - Angabe von Mittelwert und Standardfehler



**Abbildung 7: Körpergewicht und Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht der Versuchsmäuse.** Die grauen Balken kodieren die Tiere aus der drei Monate alten und die weißen Balken die Tiere aus der sechs Monate alten Versuchsgruppe. \* p < 0.05. n = 10-14. Angabe von Mittelwert und Standardfehler.

#### 3.3. Ergebnisse der histologischen Auswertung

In den nachfolgenden Abbildungen (Abb. 8 und 9) sind Bilder der Nierenrinde zufällig ausgewählter Versuchstiere aus allen Gruppen zu sehen. Die Bilder wurden bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen. In Abb. 8 handelt es sich um Bilder der H.E. gefärbten Präparate. Wie bereits oben erwähnt handelt es sich bei der H.E.-Färbung um eine Übersichtsfärbung mit Hilfe welcher die Organmorphologie überprüft werden kann. Keines der H.E.-Präparate wies bei mikroskopischer Betrachtung Strukturveränderungen auf. In Abb. 9 sind Bilder der PSR gefärbten Schnitte abgebildet. Es ist zu erkennen, dass sowohl die Glomeruli als auch die Tubuli von einer dünnen Kollagenschicht umgeben sind. Im Niereninterstitium sind keine roten Areale und somit keine Kollageneinlagerungen zu sehen.



Abbildung 8: Mikroskopische Darstellung ausgewählter H.E.-Schnitte



Abbildung 9: Mikroskopische Darstellung ausgewählter PSR-Schnitte

In Abb. 10 ist ersichtlich, dass die PSR positiv angefärbte Fläche der Nieren keine signifikanten alters- oder Genotyp abhängigen Unterschiede aufweist. Es zeigt sich, dass die Versuchstiere der drei Monate alten WT Gruppe mit einer durchschnittlich 0,10 %igen PSR positiv gefärbten Fläche den geringsten gefärbten Anteil aufweisen. Die sechsmonatige KI Gruppe zeigt hingegen mit einer durchschnittlichen PSR positiv gefärbten Nierenfläche von 0,20 % den höchsten Wert.



PSR positiv gefärbte Fläche der Nieren

**Abbildung 10: PSR positiv gefärbte Fläche der Nieren in %.** Die grauen Balken kodieren die Tiere aus der drei Monate alten und die weißen Balken die Tiere aus der sechs Monate alten Versuchsgruppe. n = 5-6. Angabe von Mittelwert und Standardfehler.

# 4. Diskussion

Mit dieser Studie wurden die Auswirkungen der inaktivierenden KLHL3 R528H Mutation bei männlichen Mäusen auf C57BL/6 Hintergrund nach drei- und sechsmonatiger Versuchsdauer bestimmt.

Bei den Versuchstieren kommt es zu einem funktionellen Knock-out, wodurch KLHL3 WNK1 und WNK4 nur noch mit geringer Affinität bindet und zum Abbau markiert. Es ist beschrieben, dass KLHL3<sup>R528H/+</sup> Versuchsmäuse eine Überexpression von WNK1 und WNK4 Proteinen zeigen und dadurch die WNK-OSR1/SPAK-NCC Phosphorylierungskaskade im Tubulus contortus distalis steigern. Die Folge sind überaktive Natrium-Chlorid-Cotransporter (Susa et al. 2014; Furusho et al. 2020). Das hat Susa et al. in seiner Studie 2014 beschrieben und bestätigt, da die mRNA Konzentration von WNK 1 und WNK4 in den Nieren der betroffenen Mäuse nicht erhöht war (Susa et al. 2014). Die Erhöhung der betreffenden mRNA Konzentration würde für eine gesteigerte Transkription der mRNA sprechen und könnte damit die Ursache für die erhöhte Menge an WNK1 und WNK4 Proteinen sein. Da die mRNA Konzentration der WNK-Proteine nicht erhöht ist, kann Transkription als Ursache für die WNK1- und WNK4-Erhöhung ausgeschlossen werden und lässt auf einen mangelnden Abbau der beiden WNK-Proteine durch den CUL3-KLHL3 E3 Ligase-Komplex schließen (Susa et al. 2014). Durch diese Mutation kann das Krankheitsbild des Pseudohypoaldosteronismus Typ 2 (PHA2) induziert werden. Der PHA2 führt bei den Betroffenen zu Hyperkaliämie, einer metabolischen Azidose und salzsensitiver Hypertonie. Die GFR bleibt hingegen in der Regel unverändert (Furusho et al. 2020; Susa et al. 2014). Studien aus der Humanmedizin berichten auch, dass Betroffene eine leichte Hyperchlorämie entwickeln (Mayan et al. 2002).

In dieser Studie wies der Kaliumgehalt im Serum zwischen einzelnen Gruppen signifikante Unterschiede auf, aber der Kaliumspiegel im Blut liegt bei Mäusen laut Fachliteratur physiologischerweise zwischen 3,8 – 8 mmol/l (Ewringmann and Glöckner). Verglichen mit dieser Literatur liegen die Kaliumwerte aller Mausgruppen in der Norm. Die amerikanische Forschungsanstalt The Jackson Laboratory hat eine Zusammenfassung der physiologischen Parameter von weiblichen und männlichen C57BL/6J Mäusen im Alter von 24 bis 78 Wochen veröffentlicht. Die männlichen sechs Monate alten Mäuse der Forschungsanstalt wiesen einen Kaliumgehalt im Serum von durchschnittlich 4,0 +/- 0,2 mmol/l auf (The Jackson Laboratory). In der Studie von Susa et all. wurden 10 Wochen alte Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund verwendet. Der Kaliumserumgehalt der WT Mäuse lag mit 4,1 +/- 0,1 mmol/l im Referenzbereich des Jackson Laboratory. Mit einem p-Wert <°0,05 war der Kaliumgehalt im

Serum sowohl von den KLHL3<sup>R528H/+</sup> Mäusen (4,8 +/- 0,1 mmol/l), als auch von den KLHL3<sup>R528H/R528H</sup> Mäusen (4,8 +/- 0,3 mmol/l) signifikant höher als jener der WT Tiere. Somit sind die Werte der KLHL3<sup>R528H/+</sup> und der KLHL3<sup>R528H/R528H</sup> Mäuse auch signifikant höher als die Ausgangswerte des Jackson Laboratory (Susa et al. 2014). In unserer Studie liegt die dreimonatige Versuchsgruppe mit einem Kaliumgehalt im Serum von 5,2 +/- 0,18 mmol/l schon weit über der angegebenen Norm. Gleiches gilt für die sechs Monate alte WT Gruppe, die einen Kaliumwert von 5,50 +/- 0,2 mmol/ aufweist. Die Mäuse der Jackson Laboratory Forschungsanstalt haben während der Studie die LabDiet® 5K52 Diät gefüttert bekommen. Laut Herstellerangabe handelt es sich hierbei um eine ausgeglichene Futtermischung mit einem Natriumgehalt von maximal 0,58 %. In dieser Versuchsreihe wurde den Mäusen eine Standardnagerdiät gefüttert. Da die Futtermittel nicht ident sind. kann der Fütterungsunterschiede als Ursache für die große Differenz zwischen den Kaliumgehalten im Serum nicht komplett ausgeschlossen werden.

Susa et al. hat in seinem Versuch gezeigt, dass die Mäuse, welchen eine Diät mit höherem Salzgehalt gefüttert wurden, zwar keine ausgeprägtere Hyperkaliämie aufwiesen, aber der systolische Blutdruck signifikant höher war als jener der WT Mäuse (Susa et al. 2014). Auch in dieser Studie hätte man zusätzlich die Auswirkungen einer natriumreichen Diät erfassen und auswerten können. In der vorliegenden Arbeit wurde weder der pH-Wert im Blut noch der systolische Blutdruck bestimmt und kann daher auch nicht mit Ergebnissen aus bereits bestehender Literatur verglichen werden.

Die Ergebnisse der glomerulären Filtrationsrate weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Aber es ist ersichtlich, dass die GFR der sechs Monate alten Tiere niedriger ist als die der drei Monate alten Mäuse. Es wird beschrieben, dass es im Alter zu physiologischen strukturellen Veränderungen der Nieren kommt. Unter anderem nimmt die Anzahl der funktionierenden Glomeruli ab und es kommt zu einer tubulären Atrophie mit interstitieller Fibrose. Diese Umbauprozesse führen zu einer Abnahme der GFR mit zunehmenden Alter (Denic et al. 2016). Das hat sich auch in der Auswertung der PSR Präparate widergespiegelt, da die PSR positiv angefärbte Fläche bei den Gruppen der sechs Monate alten Mäusen immer höher war als bei der drei Monate alten Vergleichsgruppe. Ansonsten waren die histologischen Untersuchungen unauffällig.

Maya et all. hat beschrieben, dass Pseudohypoaldosteronismus Typ 2 beim Menschen auch zu einer milden Hyperchlorämie führen kann (Mayan et al. 2002). Ostrosky-Frid et al. haben

34

in ihrem Versuch gezeigt, dass KLHL3 R258H Gen-Knock-in Mäuse neben einer Hyperkaliämie und metabolischen Azidose, auch eine Hyperchlorämie ausgebildet haben (Ostrosky-Frid et al. 2021). Während der Versuchsdauer wurde sowohl ein Teil der Wildtyp Mäuse als auch der KLHL3<sup>+/R258H</sup> Tiere vier Tage lang eine normale Diät mit einem Kaliumgehalt von 1% gefüttert und dem anderen Teil der Gruppen wurde eine kaliumarme Diät mit einem Kaliumgehalt von 0,0% bereitgestellt. In den Ergebnissen wurde leider nicht genauer darauf eingegangen welches Futter den Versuchsgruppen bereitgestellt wurde, welche einen PHA2 entwickelt haben. Auch in dieser Studie hätte man zusätzlichen Mäusegruppen eine kaliumreduzierte bzw. wie bereits oben erwähnt eine natriumreiche Futtermischung vorlegen können und die Diät-assoziierten Auswirkungen auf die einzelnen Gruppen dokumentieren und vergleichen können. Die Jackson Laboratory Forschungseinrichtung gibt für sechs Monate alte männliche C57BL/6J Mäuse eine Serumchloridkonzentration von 111 +/- 1 mmol/l als physiologisch an. In diesem Referenzbereich waren nur die Mäuse der drei Monate alten und der sechs Monate alten WT Gruppen. Die anderen Versuchsgruppen haben diesen Wert leicht überschritten, was unter Umständen ein Hinweis auf die Ausbildung eines PHA2 sein könnte.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund mit einer KLHL3 R528H Mutation das Krankheitsbild des Pseudohypoaldosteronismus Typ 2 mit drei bzw. sechs Lebensmonaten entwickeln. Insgesamt waren 48 männliche Mäuse Teil des Versuchs. Die Probenentnahme erfolgte bei der ersten Gruppe mit drei Monaten und bei der zweiten Gruppe mit sechs Monaten. Von allen Versuchstieren wurden Urin- und Serumproben untersucht, sowie die Nieren entnommen und histologisch aufbereitet. Im Anschluss wurden jeweils sechs Tiere aus jeder Versuchsgruppe nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und die histologischen Schnitte dieser Nieren mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E). bzw. Picro-Sirius-Red-Färbung (PSR) gefärbt. Mithilfe des Probenmaterials wurde untersucht, ob die Versuchstiere mit fortschreitendem Alter eine eingeschränkte Nierenfunktion bzw. eine veränderte Nierenmorphologie entwickeln. In beiden Versuchsgruppen wurden Wildtyp Mäuse (WT, KLHL3<sup>+/+</sup>), heterozygote Mäuse (HET, KLHL3<sup>R528H/+</sup>) und homozygote Knock-in Mäuse (KI, KLHL3<sup>R528H/R528H</sup>) untersucht. Die Mutation führt dazu, dass das KLHL3 Protein WNK1 und WNK4 mit einer geringeren Affinität bindet und dadurch eine adäquate Inaktivierung bzw. einen vollständigen Abbau dieser verhindert. Als Folge wird der Natrium-Chlorid-Cotransporter (NCC) nicht dephosphoryliert und der Transporter bleibt aktiv. Es wird vermehrt Natrium und Chlorid in die Tubuluszellen aufgenommen. In früheren Studien wurde beschrieben, dass Mäuse mit der KLHL3 R528H Mutation eine Hyperkaliämie, eine metabolische Azidose, sowie einen signifikant höheren systolischen Blutdruck auf eine salzreichere Diät entwickelten. In der vorliegenden Studie war der Serumkaliumgehalt sowohl der drei Monate alten HET Mäuse, als auch der drei Monate alten KI Tiere signifikant höher als der Kaliumwert der drei Monate alten WT Mäuse. Ob es bei unserem Mausmodell ebenfalls zu einer metabolischen Azidose und zu einer Erhöhung des systolischen Blutdrucks kommt bedarf einer weiteren Versuchsreihe, da diese Parameter in dieser Studie nicht untersucht wurden. Die Ergebnisse der restlichen Untersuchungen schließen eine eingeschränkte Nierenfunktion der Versuchstiere jedoch sicher aus. Auch die histologischen Untersuchungen waren unauffällig und in den H.E. Präparaten waren keine strukturellen Veränderungen ersichtlich.

## 6. Summary

The aim of the present work was to investigate if mice with a KLHL3 R528H mutation on C57BL/6 background develop the clinical picture of pseudohypoaldosteronism type 2 at the age of three or six months. A total of 48 male mice were part of the experiment. Sampling was performed at three months of age for the first group and at six months of age for the second group. Urine and serum samples were examined from all mice and the kidneys were harvested and histologically processed. Six animals from each experimental group were randomly selected and the histological sections of these kidneys were stained with hematoxylin and eosin staining (H.E.) and picro-sirius-red-staining (PSR). The sample material was used to investigate whether the experimental animals develop impaired renal function or altered renal morphology with advancing age. In both experimental groups, wild-type mice (WT, KLHL3+/+), heterozygous mice (HET, KLHL3R528H/+), and homozygous knock-in mice (KI, KLHL3R528H/R528H) were studied. The R528H mutation causes the KLHL3 protein to bind WNK1 and WNK4 with a lower affinity, preventing adequate inactivation and degradation of WNK 1 and WNK4. As a result, the sodium chloride channel is not dephosphorylated and the transporter remains active. Sodium and chloride are continuously taken up into the tubule cells. Earlier studies have shown that mice with the KLHL3R528H mutation develop hyperkalemia, metabolic acidosis, and higher systolic blood pressure under high salt diet. In this study, the serum potassium level of both the three-month-old HET mice and the three-month-old KI group was significantly higher than the potassium level of the three-month-old WT mice. If metabolic acidosis and a high systolic blood pressure also occurs in our mouse model requires further studies, as these parameters were not investigated in this study. However, the results of the remaining examinations exclude an impaired renal function. The histological examinations were also unremarkable and no structural changes were evident in the H.E. preparations of the kidney.

# 7. Abkürzungsverzeichnis

AT I	Angiotensin I
AT II	Angiotensin II
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACVIM	American College of Veterinary Internal Medicine
ADH	anti-diuretisches Hormon
APES	3-Aminopropyltriethoxysilan
ATP	Adenosintriphosphat
CUL3	Cullin 3 Protein
ENaC	epitheliale Natriumkanäle
FEx	fraktionelle Exkretion der einzelnen Elektrolyte
FHH	familiäre hyperkaliämische Hypertonie
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
H.E.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HET	Heterozygote Maus
HG	Herzgewicht
HMV	Herzminutenvolumen
KG	Körpergewicht
KI	Knock-in Maus
KIR	nach innen gerichtete Kaliumkanäle
KLHL3	Kelch-like 3 Protein
MAD	mittlerer arterieller Blutdruck
NCC	Natrium-Chlorid-Cotransporter
OSR1	oxidative stress-responsive gene 1

- PHA2 Pseudohypoaldosteronismus Typ 2
- PFA Paraformaldehyd
- PSR Picro-Sirius-Red-Färbung
- RAAS Renin-Angiotensis-Aldosteron-System
- ROMK renal outer medullary potassium channel
- SGK1 Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase 1
- SPAK Ste20-related proline–alanine-rich kinase
- TPR totaler peripherer Widerstand
- WNK With-No-Lysin-Kinase
- WT Wildtyp Maus

# 8. Abbildungs-/ Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt einer Niere.	4
Abbildung 2: Corpusculum renale (Nierenkörperchen) und Übergang zum Tubulussystem.	6
Abbildung 3: Das Nephron	7
Abbildung 4: Ionentransporter im Tubulussystem	9
Abbildung 5: Serum-, Uringehalt und fraktionelle Exkretion der Elektrolyte Kalium, Natri	um,
Kalzium, Chlorid und Phosphor	. 26
Abbildung 6: Urinvolumen und glomeruläre Filtrationsrate.	. 27
Abbildung 7: Körpergewicht und Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht der Versuchsmäu	ise.
	. 29
Abbildung 8: Mikroskopische Darstellung ausgewählter H.ESchnitte	. 30
Abbildung 9: Mikroskopische Darstellung ausgewählter PSR-Schnitte	. 31
Abbildung 10: PSR positiv gefärbte Fläche der Nieren in %	. 32

Tabelle 1: Anleitung zur Herstellung von 2 L 0,1 molaren Phosphatpuffer mit Sucrose	. 16
Tabelle 2: Protokoll Histokinette	. 17
Tabelle 3: Protokoll zur Herstellung von APES beschichteten Objektträger	. 18
Tabelle 4: Protokoll für die H.EFärbung	. 19
Tabelle 5: Protokoll für die PSR-Färbung	. 20
Tabelle 8: Körpergewicht und Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht - Angabe	von
Mittelwert und Standardfehler	. 28

## 9. Literaturverzeichnis

- Abdel Khalek W, Rafael C, Loisel-Ferreira I, Kouranti I, Clauser E, Hadchouel J, Jeunemaitre X. Severe Arterial Hypertension from Cullin 3 Mutations Is Caused by Both Renal and Vascular Effects. J Am Soc Nephrol. 2019;30(5):811–23. doi:10.1681/ASN.2017121307.
- Acierno MJ, Brown S, Coleman AE, Jepson RE, Papich M, Stepien RL, Syme HM. ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. J Vet Intern Med. 2018;32(6):1803–22. doi:10.1111/jvim.15331.
- Ames MK, Atkins CE, Pitt B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. J Vet Intern Med. 2019;33(2):363–82. doi:10.1111/jvim.15454.
- Denic A, Glassock RJ, Rule AD. Structural and Functional Changes With the Aging Kidney. Adv Chronic Kidney Dis. 2016;23(1):19–28. doi:10.1053/j.ackd.2015.08.004.
- DocCheck Medical Services GmbH. Arterielle Hypertonie DocCheck Flexikon. 15.09.2020. https://flexikon.doccheck.com/de/Arterielle\_Hypertonie. Accessed 15 Sep 2020.
- Engelhardt W von, Breves G, Diener M, Gäbel G, editors. Physiologie der Haustiere. 5th ed. Stuttgart: Enke Verlag; 2015.
- Ewringmann A, Glöckner B, editors. Leitsymptome bei Hamster, Ratte, Maus und Rennmaus.
- Furusho T, Uchida S, Sohara E. The WNK signaling pathway and salt-sensitive hypertension. Hypertens Res 2020. doi:10.1038/s41440-020-0437-x.
- Leong X-F, Ng C-Y, Jaarin K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. Biomed Res Int 2015. doi:10.1155/2015/528757.
- Liebich H-G, editor. Liebich Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. 4th ed. Schattauer; 2003.
- Mayan H, Vered I, Mouallem M, Tzadok-Witkon M, Pauzner R, Farfel Z. Pseudohypoaldosteronism type II: marked sensitivity to thiazides, hypercalciuria, normomagnesemia, and low bone mineral density. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87(7):3248–54. doi:10.1210/jcem.87.7.8449.
- Ostrosky-Frid M, Chávez-Canales M, Zhang J, Andrukhova O, Argaiz ER, Lerdo-de-Tejada F, et al. Role of KLHL3 and dietary K+ in regulating KS-WNK1 expression. Am J Physiol Renal Physiol. 2021;320(5):F734-F747. doi:10.1152/ajprenal.00575.2020.
- Padmanabhan S, Delles C, Dominiczak AF. Genetic factors in hypertension. Arch Med Sci. 2009;2009(2):212–9.

- Salomon F-V, Geyer H, Gille U, editors. SALOMON Anatomie für die Tiermedizin (3. Auflage). 3rd ed. Enke; 2015.
- Sasaki E, Susa K, Mori T, Isobe K, Araki Y, Inoue Y, et al. KLHL3 Knockout Mice Reveal the Physiological Role of KLHL3 and the Pathophysiology of Pseudohypoaldosteronism Type II Caused by Mutant KLHL3. American Society for Microbiology. Molecular and Cellular Biology. 2017. doi:10.1128/MCB.00508-16.
- Shibata S, Arroyo JP, Castañeda-Bueno M, Puthumana J, Zhang J, Uchida S, et al. Angiotensin II signaling via protein kinase C phosphorylates Kelch-like 3, preventing WNK4 degradation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(43):15556–61. doi:10.1073/pnas.1418342111.
- StatSoft Europe. Tukey-HSD. 2002. https://www.statsoft.de/glossary/T/TukeyHSD.htm. Accessed 3 Oct 2020.
- Susa K, Sohara E, Rai T, Zeniya M, Mori Y, Mori T, et al. Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in mutant KLHL3 knock-in mice. Human Molecular Genetics. 2014;23(19):5052–60. doi:10.1093/hmg/ddu217.
- Tackling G, Borhade MB. Hypertensive Heart Disease. 2022.
- The Jackson Laboratory. Physiological Data Summary Aged C57BL/6J.
- Valinsky WC, Touyz RM, Shrier A. Aldosterone, SGK1, and ion channels in the kidney. Clin Sci. 2018;132(2):173–83. doi:10.1042/CS20171525.
- World Health Organization. Hypertension. 2019. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension. Accessed 11 Sep 2020.