

Aus der Klinik für Nephrologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Klinikleiter: Univ.-Prof. Dr. L. Christian Rump

Eine bisher unbeschriebene homozygote Missense- Mutation als Ursache des Pseudohypoaldosteronismus Typ II

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Annika Etges
2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Ute I. Scholl

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Matthias Schott

Meinen Eltern.

I Publikation

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Etges A, Hellmig N, Walenda G, Haddad BG, Machtens JP, Morosan T, Rump LC, Scholl UI. A Novel Homozygous KLHL3 Mutation as a Cause of Autosomal Recessive Pseudohypoaldosteronism Type II Diagnosed Late in Life. *Nephron* 2022;146(4): 418-428

II Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Fall einer 58-jährigen Patientin mit arterieller Hypertonie, Hyperkaliämie, Muskelschmerzen und supprimiertem Plasma-Renin-Spiegel, bei welcher im Alter von 57 Jahren ein Pseudohypoaldosteronismus Typ II diagnostiziert wurde. Der Pseudohypoaldosteronismus Typ II, auch als Gordon-Syndrom bezeichnet, stellt eine Erkrankung aus dem Spektrum der monogenetischen Hypertonien dar. Diese Untergruppe der sekundären Hypertonien umfasst weitere seltene Erkrankungen wie den Familiären Hyperaldosteronismus, das Liddle-Syndrom und den Apparenten Mineralokortikoid-Exzess. Krankheitsverursachend sind beim Gordon-Syndrom Mutationen in den Genen *WNK1*, *WNK4*, *CUL3* und *KLHL3*. Bei der hier untersuchten Patientin konnte mittels Sanger-Sequenzierung eine bisher unbeschriebene homozygote Missense-Mutation im *KLHL3*-Gen nachgewiesen werden, welches für das Protein Kelch-like-protein (KLHL) 3, eine Ubiquitin-Ligase, codiert. KLHL3 bildet einen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex mit dem Protein Cullin-3, welcher zu einer Ubiquitylierung der „With-No-Lysine“-Kinasen WNK1 und WNK4 und in der Folge zu deren Abbau im Proteasom führt. Über diesen Signalweg erfolgt eine Regulierung des Thiazid-sensitiven Na-Cl-Cotransporters im distalen Tubulus. Wir führten eine zielgerichtete Mutagenese der *KLHL3*-cDNA durch und transfizierten COS7-Zellen mit der veränderten Plasmid-DNA. Mittels Western Blotting untersuchten wir die Effekte der p.Arg431Trp-Mutation auf die Expression von WNK4. Hier zeigte sich eine erhöhte WNK4-Expression, die sich durch eine verminderte Regulation durch KLHL3 erklären lässt. Molekulardynamik-Simulationen legten eine verminderte Stabilität des mutierten KLHL3-Proteins nahe.

III Summary

This work features a 58-year-old patient who presented with arterial hypertension, hyperkalemia, muscle pain and low plasma renin levels who was diagnosed with pseudohypoaldosteronism type II (PHA II) at the age of 57 years. PHA II or Gordon's syndrome is a monogenic form of hypertension. This subgroup of secondary hypertension includes other rare entities such as familial hyperaldosteronism, Liddle's syndrome and apparent mineralocorticoid excess. Disease-causing mutations in Gordon's syndrome have been found in the *WNK1*, *WNK4*, *CUL3* and *KLHL3* genes. In the patient investigated here, a novel homozygous *KLHL3* missense mutation was identified by Sanger sequencing. *KLHL3* encodes kelch-like protein 3, a ubiquitin ligase that forms a E3 ubiquitin ligase complex by binding to cullin 3. Ubiquitination of the with-no-lysine-kinases WNK1 and WNK4 leads to their degradation in the proteasome. This pathway eventually causes downregulation of the thiazide sensitive Na-Cl-cotransporter in the distal tubule of the nephron. We performed site-directed mutagenesis of the *KLHL3* cDNA and transfected COS7 cells with the mutated plasmid. We then investigated the effect of the p.Arg431Trp mutation on the expression of WNK4. We demonstrated an increased WNK4 expression caused by decreased KLHL3-dependent downregulation. Molecular dynamics simulations suggest a decreased stability of the mutated KLHL3 protein.

IV Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ACTH	Adrenocorticotropin
APA	Aldosteron-produzierendes Adenom
BAH	Bilateral adrenal hyperplasia/Bilaterale Nebennierenhyperplasie
CACNA1D	Calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 d-Gen
CACNA1H	Calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 h-Gen
Ca_v1.3	Spannungsgesteuerter Calciumkanal 1.3
Ca_v3.2	Spannungsgesteuerter Calciumkanal 3.2
ClC	Chloridkanal
CLCN2	Chloridkanalprotein-2-Gen
CPA	Cortisol-produzierendes Adenom
CUL3	Cullin-3-Gen
CYP11B1	Steroid-11-β-Hydroxylase-Gen
CYP11B2	Aldosteronsynthase-Gen; Steroid-18-Hydroxylase-Gen
CYP17A1	Steroid-17α-Hydroxylase-Gen
CYP21A2	Steroid-21-Hydroxylase-Gen
DNA/DNS	Desoxyribonukleotidsäure
E	Glutamat
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
EPAS1	Endotheliales PAS-Domänen-enthaltendes Protein 1-Gen
ESC	Europäische Fachgesellschaft für Kardiologie
ESH	Europäische Fachgesellschaft für Hypertonie
FH	Familiärer Hyperaldosteronismus
FH	Fumarat-Hydratase-Gen
GSH	Glukokortikoid-supprimierbarer Hyperaldosteronismus
GWAS	Genome-wide association studies
H	Histidin
HCT	Hydrochlorothiazid
HSD11B2	11-β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Typ-II-Gen
I	Isoleucin
K	Lysin
KCNJ5	Potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 5 gene; Einwärtsgleichrichter-Kaliumkanal 4-Gen
Kir	Inwardly-rectifying potassium channel
KLHL3	Kelch-like-protein 3
KLHL3	Kelch-like-protein-3-Gen
l	Liter
L	Leucin
MAX	Myc-assoziiertes-X-Faktor-Gen
mg	Milligramm
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MR	Mineralkortikoidrezeptor
N	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid

<i>NF1</i>	Neurofibromatose-Typ-1-Gen
<i>NR3C2</i>	Mineralokortikoidrezeptor-Gen
<i>OSR1</i>	Oxidative-Stress-Responsive-1-Protein
<i>P</i>	Prolin
<i>PASNA</i>	Primary aldosteronism, seizures and neurological abnormalities
<i>PCR</i>	Polymerase-Kettenreaktion
<i>Q</i>	Glutamin
<i>R</i>	Arginin
<i>RET</i>	Rezeptor-Tyrosinkinase-Gen
<i>ROMK</i>	Renaler äußerer medullärer Kaliumkanal
<i>S</i>	Serin
<i>SCNN1G</i>	Sodium channel epithelial 1 gamma subunit-Gen
<i>SDHx</i>	Succinat-Dehydrogenase-Komplex-Gene
<i>SGK1</i>	Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase 1
<i>SPAK</i>	SPS1-related proline/alanine-rich kinase
<i>SPS1</i>	Sporulation-specific protein 1
<i>STE20</i>	Serin/Threonin-Proteinkinase 20
<i>TMEM127</i>	Transmembranprotein-127-Gen
<i>V</i>	Valin
<i>VHL</i>	Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor-Gen
<i>W</i>	Tryptophan
<i>WNK</i>	With-no-lysine-Kinase
<i>WNK</i>	With-no-lysine-Kinase-Gen
<i>Y</i>	Tyrosin

V Inhaltsverzeichnis

I	Publikation	I
II	Zusammenfassung.....	II
III	Summary	III
IV	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1	Einleitung.....	1
1.1	Definition der arteriellen Hypertonie	1
1.2	Epidemiologie der arteriellen Hypertonie.....	1
1.3	Ätiologie der arteriellen Hypertonie	1
1.3.1	Monogenetische Hypertonien	2
1.3.1.1	Familiärer Hyperaldosteronismus	3
1.3.1.2	PASNA-Syndrom.....	4
1.3.1.3	Apparenter Mineralokortikoidexzess	4
1.3.1.4	Exazerbierte Hypertonie in der Schwangerschaft	5
1.3.1.5	Liddle-Syndrom	5
1.3.1.6	Pseudohypoaldosteronismus Typ II	6
1.3.1.7	Weitere monogenetische Hypertonien	7
1.4	Ethikvotum.....	8
1.5	Ziele der Arbeit	8
2	A Novel Homozygous KLHL3 Mutation as a Cause of Autosomal Recessive Pseudohypoaldosteronism Type II Diagnosed Late in Life, Etges A., Hellmig N., Walenda G., Haddad B.G., Machtens J.P., Morosan T., Rump L.C., Scholl U.I., Nephron 146 (4): 418-428 (2022).....	10
3	Diskussion.....	11
3.1	Schlussfolgerungen	15
4	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	17
5	Anhang.....	21
5.1	Fragebogen Hypertonie-Studie	21

1 Einleitung

1.1 Definition der arteriellen Hypertonie

Die arterielle Hypertonie ist bei Erwachsenen definiert als anhaltende Erhöhung des arteriellen Blutdrucks auf Werte größer als 140 mmHg systolisch und/oder 90 mmHg diastolisch. Ab diesen Werten liegt eine Hypertonie Grad 1 vor. Ab 160 mmHg systolisch bzw. 100 mmHg diastolisch besteht eine Hypertonie Grad II und ab 180 mmHg systolisch und/oder 110 mmHg diastolisch eine Hypertonie Grad III. Bei einer Erhöhung des systolischen Blutdrucks auf Werte oberhalb von 140 mmHg bei gleichzeitigem Vorliegen diastolischer Blutdruckwerte ≤ 90 mmHg besteht eine isolierte systolische arterielle Hypertonie. Als optimal werden Blutdruckwerte $\leq 120/80$ mmHg angesehen [1]. Bei Kindern jünger als 13 Jahre ist ein normaler Blutdruck definiert als Blutdruck unterhalb der 90. Perzentile für Alter, Geschlecht und Größe. Ab Werten oberhalb der 90., aber unterhalb der 95. Perzentile liegt ein erhöhter Blutdruck vor. Eine arterielle Hypertonie im Kindesalter besteht bei Blutdruckwerten oberhalb der 95. Perzentile. Bei Jugendlichen ab 13 Jahren sind Blutdruckwerte $\leq 120/\leq 80$ mmHg normal, zwischen 120-129/80-89 mmHg besteht ein erhöhter Blutdruck. Ab Blutdruckwerten $\geq 130/90$ mmHg liegt eine arterielle Hypertonie vor [2].

1.2 Epidemiologie der arteriellen Hypertonie

Bluthochdruck betrifft weltweit ca. 1,39 Milliarden Menschen und stellt in den Industrienationen einen der wichtigsten kardiovaskulären Risikofaktoren dar [3]. Männer sind häufiger von arterieller Hypertonie betroffen als Frauen, global betrifft diese ca. 24% der Männer und 20% der Frauen [4]. Nur etwa 46,5% der Betroffenen sind sich des Vorliegens erhöhter Blutdruckwerte bewusst, 40,6% erhalten eine antihypertensive Therapie [5]. Zu den bedeutendsten Folgeerkrankungen der arteriellen Hypertonie zählen Arteriosklerose, Myokardinfarkte, ischämische Hirninfarkte, Nierenversagen und Vorhofflimmern [6].

1.3 Ätiologie der arteriellen Hypertonie

Der Großteil der Hypertonien zählt zu den primären oder essentiellen Hypertonien (ca. 90% aller Hypertonie-Patienten), bei denen ein multifaktorielles Geschehen

angenommen wird, aber im Einzelnen keine spezifische Ursache für die Erkrankung gefunden werden kann [7].

Dem gegenüber steht die Gruppe der sekundären Hypertonien (ca. 10% aller Hypertonie-Patienten) bei denen ein eindeutiger Auslöser der Erkrankung vorliegt. Die häufigste Entität aus dem Formenkreis der sekundären Hypertonien stellt der primäre Hyperaldosteronismus dar, der durch eine autonome Aldosteronproduktion in den Nebennieren gekennzeichnet ist [8]. Häufig liegen diesem aldosteronproduzierende Nebennierenrindenadenome (APA) oder ein bilateraler Hyperaldosteronismus zugrunde. Darüber hinaus gibt es seltene familiäre Formen des primären Hyperaldosteronismus, auf die im Abschnitt über die monogenetischen Hypertonien näher eingegangen wird.

Weitere Ursachen sekundärer Hypertonien sind z.B. die Nierenarterienstenose, der Morbus Cushing, und die seltenen monogenetisch bedingten Hypertoniesyndrome [9, 10].

1.3.1 Monogenetische Hypertonien

Bei den monogenetischen Hypertonien handelt es sich um Erkrankungen, die bereits in einem jungen Lebensalter auftreten können [11]. Ursächlich sind Mutationen in einzelnen Genloci, die zu Funktionsverlusten oder -gewinnen von Regulatoren der Blutdruckhomöostase oder zu Aktivitätssteigerungen tubulärer Ionenkanäle in der Niere führen, welche über verschiedene Mechanismen eine Expansion des Blutplasmavolumens, Elektrolytverschiebungen und in der Folge einen Anstieg des Blutdrucks nach sich ziehen [12]. Gekennzeichnet sind fast alle monogenetischen Hypertonieformen durch eine supprimierte Plasma-Renin-Aktivität bzw. eine erniedrigte Renin-Konzentration [13]. Je nach zugrunde liegender Ursache können Serum-Aldosteron und Elektrolyte erhöht oder erniedrigt sein, was eine weitere differentialdiagnostische Eingrenzung bereits vor Durchführung genetischer Analysen erlaubt [14]. Die endgültige Diagnosestellung erfolgt dann entweder durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus genomischer DNA des Patienten mit spezifischen Oligonukleotiden für die zu untersuchende Gensequenz der bekannten krankheitsverursachenden Kandidatengene und eine anschließende Sangersequenzierung oder durch Panelsequenzierungen, die eine massive Parallelsequenzierung verschiedener Kandidatengene erlauben. Im Laufe der Zeit konnten immer mehr Genloci identifiziert werden, die für an der Blutdruckregulation beteiligte Proteine codieren und die bei

Hypertoniepatienten genetische Varianten aufweisen können. In der letzten Dekade konnten Exomsequenzierungsstudien zur Entschlüsselung genetischer Hypertoniesyndrome beitragen [15, 16]. Einige der häufigsten Formen monogenetischer Hypertonien sollen im Folgenden exemplarisch dargestellt werden.

1.3.1.1 Familiärer Hyperaldosteronismus

Zu den monogenetischen Hypertonieformen zählt der familiäre Hyperaldosteronismus (FH) mit seinen vier Unterformen. Gekennzeichnet sind diese häufig durch einen erhöhten Serum-Aldosteronspiegel und erhöhten Aldosteron-Renin-Quotienten. Daneben weist ein Teil der betroffenen Patienten eine Hypokaliämie unterschiedlichen Ausmaßes auf. Beim 1966 durch Sutherland erstmals beschriebenen und autosomal-dominant vererbten Glucocorticoid-supprimierbaren Hyperaldosteronismus (GSH, FH Typ I) kommt es durch die Bildung eines chimären Gens aus *CYP11B1* und *CYP11B2*, welche jeweils für die ACTH-abhängige 11- β -Hydroxylase bzw. die Angiotensin-II- und Kalium-abhängige Aldosteron-Synthase codieren. Dadurch entsteht eine Aldosteronsynthase, welche nicht durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, sondern ACTH-abhängig reguliert wird. Die Aktivität der chimären Aldosteronsynthase ist durch die Applikation von Glukokortikoiden im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus supprimierbar [17, 18]. Darüber hinaus wurden bisher drei weitere, nicht Glucocorticoid-supprimierbare Formen des familiären Hyperaldosteronismus beschrieben. Die betroffenen Patienten weisen heterozygote Keimbahnmutationen im für den Chloridkanal ClC-2 codierenden Gen *CLCN2* (FH Typ II) [16] oder dem für den Kaliumkanal Kir3.4 codierenden Gen *KCNJ5* (FH Typ III) auf [19]. *CLCN2*-Mutation führen zu einem erhöhten Chloridausstrom aus der Zelle. Bei Vorliegen von *KCNJ5*-Mutationen kommt es zu Natriumpermeabilität des Kaliumkanals. Beides bewirkt eine Depolarisation, die zu einer Proliferation der Zona glomerulosa und damit zur Ausbildung (bilateraler) Nebennierenrindenhyperplasien führt. Zusätzlich wird die intrazelluläre Aldosteronsynthase induziert, sodass es zu einer vermehrten Aldosteronsynthese kommt [20]. Eine weitere Form des familiären Hyperaldosteronismus wird durch heterozygote Mutationen im *CACNA1H*-Gen ausgelöst. Dieses codiert für den spannungsgesteuerten Calciumkanal Ca_v3.2. Bei den betroffenen Patienten bewirkt dies eine verringerte Inaktivierung des Kanals, die in einem erhöhten Calciumeinstrom und somit ebenfalls in einer Induktion der Aldosteronsynthase mündet [21]. Während der FH Typ I auf eine Behandlung mit Dexamethason anspricht (ggf. in Kombination mit

Mineralokortikoidrezeptorblockern), sollte bei den anderen Formen des familiären Hyperaldosteronismus eine Therapie mit einem Mineralokortikoidrezeptorantagonisten erfolgen [22].

1.3.1.2 PASNA-Syndrom

2013 beschrieben Scholl et al. Keimbahnmutationen im Gen *CACNA1D*, das für den Calciumkanal $Ca_v1.3$ codiert. Somatische Mutationen im gleichen Gen wurden parallel in aldosteronproduzierenden Adenomen nachgewiesen [23]. Eine genetische Untersuchung von Patienten mit ungeklärten Symptomen eines primären Aldosteronismus zeigte *de novo* Mutationen bei zwei Personen. Bei beiden Patienten war bereits im Kindesalter eine arterielle Hypertonie diagnostiziert worden, begleitet durch einen erhöhten Aldosteronspiegel bei supprimiertem Plasma-Renin und einer Hypokaliämie. Der erste Patient war darüber hinaus von einer biventrikulären Myokardhypertrophie betroffen, beide zeigten epileptische Anfälle [24]. Das Syndrom wird daher zusammengefasst als *primary aldosteronism, seizures and neurological abnormalities* (PASNA). Unter einer Behandlung mit dem Calciumkanalblocker Amlodipin konnten im ersten Fall normotensive Blutdruckwerte erreicht werden. Pathophysiologisch verursachen die veränderten Calciumkanäle analog zum Familiären Hyperaldosteronismus eine Depolarisation der Glomerulosazellen mit konsekutiver Induktion der Aldosteronsynthese.

1.3.1.3 Apparenter Mineralokortikoidexzess

Der 1979 durch Ulick et al. erstbeschriebene apparente Mineralokortikoidexzess kann sich bereits bei Neugeborenen in Form eines niedrigen Geburtsgewichts manifestieren. Begleitend sind Gedeihstörungen, Polydipsie und Polyurie sowie eine schwere arterielle Hypertonie mögliche klinische Symptome [25]. Laborchemisch zeigen sich ein supprimiertes Serum-Aldosteron und eine Hypokaliämie [26]. Ursächlich sind autosomal-rezessive loss-of-function Mutationen im Gen *HSD11B2*, welches für die 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ II codiert [27]. Dieses katalysiert die Umwandlung von Cortisol zu Cortison. Durch eine verminderte Enzymaktivität akkumuliert Cortisol, was zu einer gesteigerten Cortisol-vermittelten Aktivierung des Mineralokortikoidrezeptors führt. Diese wiederum führt, vermittelt durch die Kinase SGK1, zu einer vermehrten Natrium-Rückresorption über den epithelialen Natriumkanal

(ENaC) und einer vermehrten Kaliumsekretion über den Kaliumkanal ROMK im Sammelrohr, welche in einer Plasmaexpansion mit arterieller Hypertonie und Hypokaliämie resultieren [28, 29]. Hypokaliämie und Hypertonie sprechen auf eine Behandlung mit Mineralokortikoidrezeptorantagonisten wie Spironolacton an [30].

1.3.1.4 Exazerbierte Hypertonie in der Schwangerschaft

Dieses durch Geller et al. beschriebene Syndrom ist gekennzeichnet durch eine schwere therapieresistente Hypertonie mit Auftreten in einem frühen Lebensalter. Plasma-Renin und Serum-Aldosteron sind typischerweise supprimiert, mit variabler Hypokaliämie. Als Ursache konnte eine autosomal-dominante Missense-Mutation im *NR3C2*-Gen identifiziert werden, das für den Mineralokortikoidrezeptor codiert [31]. In der Folge verliert dieser seine Spezifität für Mineralokortikoide und kann auch durch andere Steroide aktiviert werden. Dazu gehört auch das Schwangerschaftshormon Progesteron, was eine Exazerbation der Hypertonie durch die Schwangerschaft einer der untersuchten Patientinnen erklärt. Es konnte zudem gezeigt werden, dass auch Cortison den mutierten MR-Rezeptor *in vitro* aktiviert [32], was eine mögliche Erklärung für das Auftreten einer arteriellen Hypertonie bei Männern und nicht-schwangeren Frauen mit *NR3C2*-Mutation liefern könnte.

1.3.1.5 Liddle-Syndrom

Das Liddle-Syndrom zeichnet sich klinisch durch eine früh einsetzende Hypertonie, begleitet durch ein supprimiertes Renin und eine Hypokaliämie aus. Als krankheitsverursachend wurden autosomal-dominant vererbte Nonsense-Mutationen in den Alpha-, Beta- und Gamma-Untereinheiten des epithelialen Natriumkanals (ENaC) identifiziert [33-35]. Diese bedingen eine Verkürzung des Proteins und somit den Verlust einer C-terminalen Aminosäuresequenz, des PPPXY-Motivs, welches für die Internalisierung der Kanaluntereinheit zum proteasomalen Abbau essentiell ist [36] [37]. Durch den resultierenden verminderten Abbau von ENaC kommt es zu einer vermehrten Natriumrückresorption und Kaliumsekretion im Sammelrohr, ähnlich wie beim apparenten Mineralokortikoidexzess. Eine Therapie mit den kaliumsparenden Diuretika Amilorid und Triamteren kann über eine Hemmung von ENaC eine Korrektur der arteriellen Hypertonie und der Hypokaliämie bewirken. Zudem kann eine salzarme Ernährung zu einer Normalisierung der erhöhten Blutdruckwerte beitragen [38].

1.3.1.6 Pseudohypoaldosteronismus Typ II

Beim Gordon-Syndrom oder Pseudohypoaldosteronismus Typ II imponieren klinisch neben einer arteriellen Hypertonie eine Hyperkaliämie, eine metabolische Azidose, ein supprimiertes Plasma-Renin und ein normaler bis erhöhter Serum-Aldosteronspiegel [39]. Ursächlich sind autosomal-dominante Mutationen in den Genen *WNK1*, *WNK4* und *CUL3* und autosomal-dominante oder -rezessive Mutationen im *KLHL3*-Gen [15, 40]. Die With-No-Lysine-Kinasen WNK1 und WNK4 regulieren den renalen Elektrolythaushalt durch Phosphorylierung der nachgeschalteten Kinasen STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase (SPAK) und oxidative stress response kinase-1 (OSR1) [41, 42]. Diese phosphorylieren den Na-Cl-Cotransporter und aktivieren somit die Natrium- und Chlorid-Rückresorption im distalen Tubulus. Daneben bewirken sie einen erhöhten parazellulären Chlorid-Rückstrom [43, 44]. Außerdem hat WNK4 eine inhibitorische Wirkung auf den Kaliumkanal ROMK [45]. Physiologisch werden die With-No-Lysine-Kinasen durch den KLHL3-CUL3-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex reguliert [46, 47]. Durch Genmutationen in *WNK1* und *WNK4* kommt es durch verschiedene Mechanismen zu einem *gain-of-function* der WNK-Kinasen. WNK1 liegt in der Niere in zwei Isoformen vor, L-WNK1, einer langen Isoform, die ubiquitär exprimiert wird und einer nierenspezifischen Isoform, KS-WNK1, die nur im distalen Nephron vorkommt [48]. Durch Deletionen im ersten Intron von *WNK1* wird die Transkription von L-WNK1 hochreguliert [40]. Missense-Varianten von *WNK1* bewirken eine verminderte Ubiquitylierung durch den KLHL3-CUL3-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex und somit einen reduzierten Abbau von KS-WNK1 im Proteasom [49]. Genmutationen in *WNK4* führen zu einem verminderten proteasomalen Abbau von WNK4, der in einer gesteigerten Phosphorylierung von SPAK und OSR1 und in der Folge durch deren Aktivierung des Na-Cl-Cotransporters in einer erhöhten Resorption von NaCl mündet. Die erhöhte Natriumreabsorption zieht eine Plasmaexpansion und somit arterielle Hypertonie nach sich. Des Weiteren wird durch eine vermehrte WNK4-abhängige Inhibition von ROMK weniger Kalium sezerniert, wodurch es zu einer Hyperkaliämie kommt. Weitere Keimbahnmutationen betreffen die an der Bildung des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes beteiligten Proteine Cullin-3 und KLHL3. Autosomal-dominante Mutationen im *CUL3*-Gen, das für das Protein Cullin-3 codiert, bewirken einen Funktionsverlust des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes und somit einen verminderten proteasomalen Abbau von WNK4. Weitere autosomal-dominant oder autosomal-rezessiv vererbte Mutationen betreffen das Gen *KLHL3*, das für das *Kelch-like*

protein 3 (KLHL3) codiert. Da dieses ebenfalls an der Bildung des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes beteiligt ist, ziehen die beschriebenen Mutationen ebenso eine verminderte Regulation des NaCl-Cotransporters nach sich [50].

Die Therapie des Gordon-Syndroms erfolgt durch eine Thiazidgabe. Hierdurch wird der Na-Cl-Cotransporter gehemmt, was die Na-Cl-Rückresorption reguliert. Sekundär resultiert hieraus eine erhöhte Kaliumausscheidung, sodass neben einer Normalisierung des Blutdrucks auch eine Normalisierung des Serumkaliums möglich wird [51, 52].

1.3.1.7 Weitere monogenetische Hypertonien

Neben den beschriebenen gibt es eine Reihe weiterer monogenetischer Hypertonie-Syndrome.

Hierzu zählen die durch Bilginturan et al. erstbeschriebene autosomal-dominante Hypertonie mit Brachydaktylie, die durch Mutationen in *PDE3A* verursacht wird und durch einen Funktionsgewinn der Phosphodiesterase 3A zu einer arteriellen Hypertonie, einer vermehrten Fibroblastenproliferation, einem Gefäß-Nerven-Kontakt im Bereich des Hirnstamms und frühzeitigen Schlaganfällen führen kann [53-55].

Bei der kongenitalen Nebennierenhyperplasie kommt es bei der Mehrheit der betroffenen Patienten zu einem Salzverlustsyndrom mit Hypotonie, allerdings gibt es seltene Unterformen, die im Gegensatz dazu durch eine arterielle Hypertonie gekennzeichnet sind. Der Erkrankung liegen autosomal-rezessive Mutationen in verschiedenen an der Steroidsynthese beteiligten Enzymen zugrunde. Bei einem Großteil der Betroffenen liegt hier eine Compound-Heterozygotie vor [56]. Bei der häufigsten Unterform, die durch einen 21-Hydroxylase-Mangel durch Mutationen in *CYP21A2* verursacht wird, kann es bei betroffenen Mädchen zur Ausbildung eines uneindeutigen äußeren Genitals kommen, zudem ist ein angeborenes Salzverlustsyndrom mit Hypotonie und Dehydratation möglich. Mildere Verlaufsformen mit einem späteren Erkrankungsalter können mit einem Hirsutismus, Anovulation und unregelmäßigem Zyklus einhergehen. Bei Vorliegen von Mutationen in *CYP11B1* und *CYP17A1* resultieren ein 11-beta-Hydroxylase-Mangel bzw. ein 17-alpha-Hydroxylase-Mangel. Bei Vorliegen einer dieser beiden Unterformen kumulieren Metabolite mit einer erhöhten mineralokortikoiden Wirkung, die in der Folge zu einer erhöhten Natriumreabsorption, Plasmaexpansion und arteriellen Hypertonie führen [57, 58].

Das hereditäre Phäochromozytom-Paragangliom-Syndrom ist gekennzeichnet durch das Auftreten neuroendokriner Tumoren, die Katecholamine sezernieren können. Dadurch kommt es zu einem Blutdruckanstieg. Des Weiteren sind Kopfschmerzen, Palpitationen und Unruhe mögliche Symptome. Ursächlich sind autosomal-dominante Keimbahnmutationen in einer Reihe verschiedener Genloci. Hierzu gehören, neben verschiedenen *SDHx*-Genen, *VHL*, *FH*, *EPAS1*, *NF1*, *RET*, *TMEM127* und *MAX* [59, 60].

1.4 Ethikvotum

Der Ethikantrag mit dem Titel „Genetische Untersuchungen bei familiären Störungen der Blutdruckregulation und des Elektrolythaushaltes, bei familiärer Nichtanlage der maxillären lateralen Schneidezähne und bei Nebennierentumoren“ wurde am 19.07.2013 durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät unter der Studiennummer 4330 bewilligt, die Amendments zum Ethikvotum am 09.12.2015, 16.12.2015 und 05.01.2016 genehmigt.

1.5 Ziele der Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, anhand des Falls einer 58-jährigen Patientin zu demonstrieren, dass monogenetische Varianten auch im fortgeschrittenen Lebensalter ursächlich für eine arterielle Hypertonie sein können. Ältere Patienten werden bisher nur selten auf das Vorliegen einer monogenetischen Hypertonie untersucht, da bei den meisten Personen in höherem Lebensalter ein multifaktorielles Geschehen im Sinne einer essentiellen Hypertonie angenommen wird. In der klinischen Diagnostik spielen die monogenetischen Ursachen des Bluthochdrucks eine eher untergeordnete Rolle. Das Screening fokussiert sich in der Regel auf die häufigsten sekundären Hypertonieursachen wie das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom, die Nierenarterienstenose, chronische renoparenchymatöse Erkrankungen und endokrine Erkrankungen. Dies spiegelt sich in den aktuellen ESC/ESH-Leitlinien von 2018 wider. Eine genetische Testung wird hierin nicht als Routinediagnostik empfohlen, sondern soll nur bei ausgewählten Patienten in spezialisierten Zentren durchgeführt werden [1].

Aufgrund der Seltenheit genetischer Hypertoniesyndrome ist eine umfangreiche Gendiagnostik bei einem großen Teil der Patienten mit Hypertonie auch nicht indiziert. Es steht ein großes Repertoire an Antihypertensiva unterschiedlicher Wirkmechanismen

zur Erstlinientherapie zur Verfügung. Medikamente der ersten Wahl sind ACE-Hemmer, Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten, Betablocker, Calciumkanalblocker und Diuretika. Die aktuellen Leitlinien empfehlen für die meisten Patienten eine initiale Kombinationstherapie aus zwei Präparaten, welche bei unzureichendem Ansprechen um weitere Wirkstoffe ergänzt werden kann. Eine Monotherapie wird lediglich bei Vorliegen systolischer Blutdruckwerte < 150 mmHg, bei hochnormalen Blutdruckwerten bei gleichzeitigem Vorliegen eines erhöhten kardiovaskulären Risikos und bei älteren, gebrechlichen Patienten empfohlen. Versagen diese Therapieregime und erscheint eine monogenetische Ursache des Bluthochdrucks aufgrund einer auffälligen Familienanamnese, einer charakteristischen Begleitsymptomatik oder typischen Laborkonstellation möglich, kann eine genetische Diagnostik in Erwägung gezogen werden, um durch die Diagnosestellung und anschließende Therapieanpassung Endorganschäden vorzubeugen. Die Kenntnis monogenetischer Hypertonien und ihrer zugrunde liegenden pathophysiologischen Vorgänge kann durch die Diagnosestellung so ein zielgerichteteres therapeutisches Vorgehen ermöglichen. Hierin liegt ein möglicher klinischer Nutzen der Gendiagnostik für die Patienten, sodass diese auch bei älteren Patienten mit arterieller Hypertonie angezeigt sein kann.

Ein weiteres Ziel dieser Studie besteht darin, die Pathophysiologie des Pseudohypoaldosteronismus Typ II näher zu entschlüsseln. Es konnte eine bisher nicht vorbeschriebene homozygote Missense-Mutation im *KLHL3*-Gen nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollen deren Auswirkungen auf die Struktur, Stabilität und Funktion des veränderten KLHL3-Proteins charakterisiert werden. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf der Interaktion mit dem Protein WNK4 und dem Einfluss auf dessen Expression.

2 Publierte Originalarbeit

Etges A, Hellmig N, Walenda G, Haddad BG, Machtens JP, Morosan T, Rump LC, Scholl UI. A Novel Homozygous KLHL3 Mutation as a Cause of Autosomal Recessive Pseudohypoaldosteronism Type II Diagnosed Late in Life. *Nephron* 2022;146(4): 418-428

<https://doi.org/10.1159/000521626>

3 Diskussion

Anhand des geschilderten Falles konnte gezeigt werden, dass eine genetische Diagnostik im Rahmen der Hypertonieabklärung auch bei erwachsenen Patienten mit länger andauernden Krankheitsverläufen zur Diagnose eines genetischen Hypertoniesyndroms führen kann. Im klinischen Alltag wird diese in der Regel nur bei Patienten veranlasst, bei denen eine Hypertonie bereits im Kindes- und Jugendalter klinisch manifest wird und bei denen aufgrund der Familienanamnese oder supprimierter Reninwerte eine monogenetische sekundäre Hypertonie als wahrscheinlich angesehen wird, oder bei Patienten mit Phäochromozytom [1, 61]. Eine genetische Routinediagnostik bei erwachsenen Hypertoniepatienten empfehlen die aktuellen Leitlinien nicht. Das liegt darin begründet, dass die arterielle Hypertonie eine weltweit hohe Prävalenz hat und essentielle, multifaktoriell bedingte Formen den weitaus größten Anteil unter den arteriellen Hypertonien ausmachen, wohingegen die genetisch bedingten Hypertonien sehr selten sind. Die Suche nach monogenetischen Hypertonieformen in der Kohorte der erwachsenen Hypertonie-Patienten gestaltet sich auch durch das häufige Vorliegen weiterer kardialer und nephrologischer Begleiterkrankungen schwierig. Zusätzlich erschwert werden kann die Diagnostik durch eine vorbestehende antihypertensive Therapie, welche durch ihre Wirkung auf das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem zu einer Veränderung der Plasma-Renin-Aktivität und des Serum-Aldosteron-Spiegels führt. Dadurch bedingt sind die eingangs geschilderten charakteristischen Laborkonstellationen oft nicht in dieser Form nachweisbar [62]. Analog gilt dies auch für therapiebedingte Elektrolytveränderungen. Aus oben genannten Gründen liegt die Vermutung nahe, dass monogenetische Hypertonien unter erwachsenen Patienten mit Bluthochdruck unterdiagnostiziert sind und, wenn überhaupt, dann erst spät diagnostiziert werden.

Im Fall der von uns untersuchten Patientin war eine arterielle Hypertonie bereits seit dem 41. Lebensjahr bekannt [63]. Eine Begleitsymptomatik hatte zu Anfang nicht bestanden. Im Alter von 47 Jahren war erstmals eine Hyperkaliämie diagnostiziert worden. Erst nach einem Herzinfarkt im Alter von 57 Jahren waren Muskelkrämpfe klinisch manifest geworden. Die durch die behandelnden Ärzte veranlasste Labordiagnostik hatte zudem eine metabolische Azidose und eine Hyperkaliämie (7,3 mmol/l) gezeigt, woraufhin eine Vorstellung der Patientin in der Hypertoniesprechstunde der Klinik für Nephrologie am

Universitätsklinikum Düsseldorf veranlasst worden war. Dort wurde erstmalig die Verdachtsdiagnose Hypertonie mit Hyperkaliämie (Gordon-Syndrom) gestellt. Die antihypertensive Vormedikation mit Valsartan in Kombination mit Hydrochlorothiazid war nach dem Herzinfarkt abgesetzt worden. Erst nach Beendigung der Thiazidtherapie waren eine Hyperkaliämie und Muskelkrämpfe aufgetreten.

Aufgrund der charakteristischen Klinik wurde die Patientin in unsere Studie zu monogenetischen Hypertonien eingeschlossen und eine genetische Untersuchung auf das Vorliegen eines Pseudohypoaldosteronismus Typ II mittels PCR und Sangersequenzierung der Gene *WNK1*, *WNK4*, *CUL3* und *KLHL3* durchgeführt. Diese hatte eine homozygote Missense-Mutation R431W in Exon 9 von *KLHL3* gezeigt, welche in der Literatur nicht vorbeschrieben war.

In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei den Eltern der Patientin um Cousin und Cousine ersten Grades handelt und dass bei der Patientin eine homozygote Missense-Mutation im *KLHL3*-Gen nachgewiesen wurde, gehen wir davon aus, dass die Eltern beide heterozygote Träger der *KLHL3*-Mutation waren und beide jeweils das mutierte Allel an die Patientin weitervererbt haben. Die Mutter war zum Zeitpunkt der Vorstellung der Patientin bereits verstorben, ebenso wie der Bruder der Patientin. Auch der Vater der Patientin konnte nicht für die Studie rekrutiert werden. Somit ergab sich bei fehlender weiterer Verwandtschaft keine Möglichkeit, weitere Familienmitglieder genetisch zu untersuchen. Bei dem Bruder der Patientin wäre das Vorliegen einer Heterozygotie oder Homozygotie für die bei der Patientin nachgewiesene Mutation in *KLHL3* denkbar, da er, ebenso wie die Eltern, kardiovaskuläre Ereignisse in der Krankengeschichte aufwies und im Alter von 55 Jahren in der Türkei an einer nicht näher beschriebenen Nierenerkrankung verstorben war. Die Mutter war im Alter von 63 Jahren an einem Hirninfarkt verstorben, der Vater hatte aufgrund einer koronaren Herzerkrankung bereits mehrere Bypass-Operationen und Stent-Implantationen erhalten. Ob das klinische Bild eines Gordon-Syndroms bei dem Bruder der Patientin vorgelegen hat, blieb unklar.

Nach der Diagnosestellung wurde die antihypertensive Medikation der Patientin angepasst. Es erfolgte die Applikation des Thiaziddiuretikums Hydrochlorothiazid (HCT) in einer Dosierung von 25 mg einmal täglich. Unter dieser Therapie normalisierte sich der Serumkaliumwert und die Muskelkrämpfe sistierten. Innerhalb weniger Wochen gelang eine Blutdruckeinstellung auf normotensive Werte. Eine probatorische

Dosisreduktion auf 12,5 mg HCT bewirkte ein Wiederauftreten der Hypertonie und Hyperkaliämie, sodass die Therapie mit 25 mg HCT täglich fortgeführt wurde.

Die Kenntnis der der arteriellen Hypertonie zugrunde liegenden molekularbiologischen Ursache konnte in diesem Fall demnach zu einer Optimierung der antihypertensiven Therapie beitragen. In dem Wissen, dass es pathophysiologisch durch eine verminderte Regulation von WNK4 durch den E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex zu einer erhöhten WNK4-Konzentration in der Zelle, dadurch zu einer vermehrten Phosphorylierung der nachgeschalteten Kinasen SPAK und OSR1 und schließlich zur vermehrten Aktivierung des Natriumchlorid-Cotransporters kam, konnte dieser durch ein dort ansetzendes Medikament gezielt inhibiert werden. Ähnliche Therapieverläufe finden sich in der Literatur bei weiteren Patienten mit Gordon-Syndrom.

Auch bei den durch Boyden et al. 2012 beschriebenen Fällen konnte die klinische Symptomatik durch Thiaziddiuretika erfolgreich behandelt werden [15]. Vergleichbare Ergebnisse liefern auch Fallberichte anderer Autoren.

Mayan et al. beschrieben 2002 eine große Familie mit Pseudohypoaldosteronismus Typ II mit 8 betroffenen Patienten. Alle wiesen dieselbe Missense-Mutation in *WNK4* (Q565E) auf. Es erfolgte eine Behandlung mit HCT, unter der bei allen Probanden eine Reduktion des Serumkaliumspiegels und bei allen hypertensiven Patienten eine Senkung des arteriellen Blutdrucks eintrat [64].

2017 berichteten Kliuk-Ben Bassat et al. über eine konsanguine Familie mit zwei von Pseudohypoaldosteronismus Typ II betroffenen Personen. Beide zeigten die gleiche homozygote Mutation in *KLHL3* (S553L). Es handelte sich um eine 35 Jahre alte Frau und ihren 26 Jahre alten Bruder. Bei beiden lag eine Hyperkaliämie vor, bei der ersten Patientin zusätzlich eine arterielle Hypertonie. Beide sprachen auf eine Thiazidbehandlung an, allerdings traten hierunter bei dem männlichen Probanden weiterhin Schwankungen des Kaliumwertes auf. Sieben weitere Verwandte waren heterozygot für die nachgewiesene Variante, allerdings nicht klinisch betroffen [65].

Anglani et al. beschrieben 2021 zwei weitere Familien mit Hypertonie und Hyperkaliämie. Bei dem ersten Fall handelte es sich um einen 17-jährigen Jungen mit milder Hypertonie, niedrig-normalen Renin- und Aldosteronspiegeln, Hyperkaliämie und metabolischer Azidose und dessen 50-jährigen Vater, der ebenfalls von einer leichten

Hypertonie, Hyperkaliämie und metabolischen Azidose betroffen war. Bei beiden Probanden wurde die gleiche heterozygote Variante in *WNKI* (E630K) nachgewiesen. Die Gabe von 12,5 mg HCT korrigierte in beiden Fällen die Hyperkaliämie und metabolische Azidose. Der zweite Fall war der einer 20-jährigen Frau, die ebenfalls eine Hyperkaliämie und metabolische Azidose zeigte. Renin und Aldosteron waren im niedrig-normalen Bereich. Bei dieser Patientin wurden eine heterozygote Mutation (N529H) in *KLHL3* sowie eine heterozygote Mutation (I226V) in *SCNN1G* nachgewiesen. Eine initiale Behandlung mit 12,5 mg HCT hatte keinen Effekt gezeigt, nach einer Dosissteigerung auf 25 mg normalisierten sich die Blutwerte [52].

Während die arterielle Hypertonie nach Sambharia et al. ein Symptom variabler Ausprägung beim Gordon-Syndrom darstellte, war die Hyperkaliämie charakteristisch [66].

Anhand dieser Fallbeispiele lässt sich durch die Anpassung der antihypertensiven Therapie ein direkter klinischer Nutzen der genetischen Diagnosestellung für die Patienten zeigen. Die Grundlagenforschung liefert hierfür die Basis. So konnten im Laufe der letzten Jahrzehnte mit zunehmenden Untersuchungsmöglichkeiten in der genetischen Forschung und mittels moderner Sequenzierungsmethoden immer mehr Krankheitsbilder auf molekularbiologischer Ebene entschlüsselt werden. Bei den monogenetischen Hypertonien werden durch klinische Studien immer wieder neuartige Mutationen in den bereits bekannten krankheitsverursachenden Genen nachgewiesen, die durch unterschiedlich ausgeprägte Veränderungen am betroffenen Protein zu Fehlregulationen innerhalb der Zelle führen. Darüber hinaus liefern Exomsequenzierungsstudien Hinweise auf weitere, neue Genloci, die mit dem Auftreten familiärer Hypertonien assoziiert sein könnten. So konnten durch diese Methode in den letzten Jahren z.B. die dem Familiären Hyperaldosteronismus Typ IV zugrunde liegenden Veränderungen im *CLCN2*-Gen, das für den spannungsgesteuerten Calciumkanal CLC-2 codiert, aufgedeckt werden [16].

Die molekulardynamische Analyse des veränderten KLHL3-Proteins wies auf eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Proteinstabilität hin. Die R431W-Mutation ist im Inneren des Proteins, am Übergang zwischen dem 3. und 4. Propellerblatt gelegen. Hier zeigte sich im Rahmen der Simulationen eine erhöhte strukturelle Dynamik vereinbar mit einer Veränderung innerhalb der Tertiärstruktur von KLHL3. Weitergehende Analysen zeigten eine verminderte Anzahl von Wasserstoffbrücken innerhalb des mutierten

Proteins, hinweisend auf eine verringerte Stabilität. Des Weiteren konnten elektrostatische Veränderungen innerhalb der Bindungstasche für WNK4 nachgewiesen werden. Die errechneten Potentiale waren zu negativeren Spannungen hin verschoben, was eine Bindung des ebenfalls negativ geladenen WNK4-Motivs erschweren dürfte.

Diese Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass sich die R431W-Mutation in KLHL3 sowohl auf die Stabilität als auch auf die Bindungseigenschaften des KLHL3-Proteins und somit auf dessen Interaktion mit WNK4 auswirkt.

Eine reduzierte Stabilität der KLHL3-Mutante konnte auch durch die Ergebnisse der funktionellen Analysen untermauert werden. Die Expression von WNK4 war in Zellen, die die KLHL3-Mutante exprimierten, signifikant höher, als in Zellen, in denen der KLHL3-Wildtyp vorlag. Da WNK4 *in vivo* KLHL3-abhängig durch den E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex dem proteasomalen Abbau zugeführt wird, lässt sich aus den Ergebnissen der Western-Blot-Analysen ableiten, dass durch die KLHL3-R431W-Mutante eine verminderte Regulation von WNK4 resultiert. Ein Cycloheximide-Chase-Assay zeigte, dass die R431W- KLHL3-Mutante tatsächlich schneller abgebaut wird als das Wildtyp-Protein.

Vor dem Hintergrund der Literatur lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass durch die verminderte Proteinstabilität, den schnelleren Proteinabbau sowie die veränderten Bindungseigenschaften von R431W-KLHL3 die Regulation von WNK4 und somit in der Folge auch der Abbau des Natriumchlorid-Cotransporters gehemmt wird. Dies führt letztendlich zu einer Überaktivität des Na-Cl-Cotransporters, die das klinische Bild des Pseudohypoaldosteronismus Typ II mit arterieller Hypertonie und Hyperkaliämie nach sich zieht. Andere, vorbeschriebene Mutationen im *KLHL3*-Gen bewirken über einen Aminosäureaustausch an anderen Stellen im Peptid ähnliche Effekte, erreichen diese aber über leicht abweichende elektrostatische und biochemische Veränderungen innerhalb der Struktur von KLHL3.

3.1 Schlussfolgerungen

Wie eingangs geschildert, stellt die arterielle Hypertonie aufgrund ihrer hohen Prävalenz einen der bedeutendsten modifizierbaren kardiovaskulären Risikofaktoren weltweit dar. Die Erforschung der Ursachen sekundärer Hypertonien ermöglicht eine Entschlüsselung

der komplexen Physiologie der menschlichen Blutdruckregulation. Es ist zu erwarten, dass in den nächsten Jahren weitere an der Blutdruckhomöostase beteiligte Gene aufgedeckt werden. Der Wissenszuwachs innerhalb der letzten Dekade auf diesem Gebiet spricht dafür. In den 2010er-Jahren wurden durch die genetische Untersuchung von Hypertoniepatienten krankheitsverursachende Mutationen in einer Reihe von Genloci nachgewiesen, die bis dato nicht mit der Entstehung von Erkrankungen in Verbindung gebracht worden waren.

Bei der von uns beschriebenen Patientin konnte bei einem bekannten, über Jahrzehnte erforschten Krankheitsbild eine bisher unbeschriebene, homozygote Genmutation in *KLHL3* nachgewiesen werden. Bei ihr waren bereits Endorganschädigungen in Form einer chronischen Niereninsuffizienz und eines Myokardinfarktes aufgetreten. Eine arterielle Hypertonie war zum Zeitpunkt der Vorstellung bereits seit 16 Jahren bekannt gewesen, und eine frühere Diagnosestellung hätte hier möglicherweise durch eine frühzeitige zielgerichtete Therapie eine Abwendung dieser Komplikationen ermöglichen können.

Die gewonnenen Erkenntnisse über den Einfluss der R431W-Mutation auf die Funktion des veränderten KLHL3-Proteins und dessen Zusammenwirken mit WNK4 tragen dazu bei, die Interaktionen zwischen diesen intrazellulären Regulatoren des Na-Cl-Cotransporters besser zu verstehen. Zudem beleuchten sie die Auswirkungen eines einzelnen Aminosäureaustauschs auf die Struktur und Dynamik innerhalb des veränderten KLHL3-Proteins.

4 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Williams, B., et al., *2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH)*. European Heart Journal, 2018. **39**(33): p. 3021-3104.
2. Flynn, J.T. and B.E. Falkner, *New Clinical Practice Guideline for the Management of High Blood Pressure in Children and Adolescents*. Hypertension, 2017. **70**(4): p. 683-686.
3. Mills, K.T., A. Stefanescu, and J. He, *The global epidemiology of hypertension*. Nature Reviews Nephrology, 2020. **16**(4): p. 223-237.
4. Zhou, B., et al., *Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants*. The Lancet, 2017. **389**(10064): p. 37-55.
5. Chow, C.K., et al., *Prevalence, Awareness, Treatment, and Control of Hypertension in Rural and Urban Communities in High-, Middle-, and Low-Income Countries*. JAMA, 2013. **310**(9): p. 959-968.
6. Lim, S.S., et al., *A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. **380**(9859): p. 2224-60.
7. Oparil, S., et al., *Hypertension*. Nat Rev Dis Primers, 2018. **4**: p. 18014.
8. Fernandes-Rosa, F.L., S. Boulkroun, and M.-C. Zennaro, *Genetic and Genomic Mechanisms of Primary Aldosteronism*. Trends in Molecular Medicine, 2020. **26**(9): p. 819-832.
9. Rossier, B.C., M. Bochud, and O. Devuyst, *The Hypertension Pandemic: An Evolutionary Perspective*. Physiology (Bethesda), 2017. **32**(2): p. 112-125.
10. Rimoldi, S.F., U. Scherrer, and F.H. Messerli, *Secondary arterial hypertension: when, who, and how to screen?* Eur Heart J, 2014. **35**(19): p. 1245-54.
11. Simonetti, G.D., M.G. Mohaupt, and M.G. Bianchetti, *Monogenic forms of hypertension*. European Journal of Pediatrics, 2012. **171**(10): p. 1433-1439.
12. Levanovich, P.E., A. Diaczok, and N.F. Rossi, *Clinical and Molecular Perspectives of Monogenic Hypertension*. Curr Hypertens Rev, 2020. **16**(2): p. 91-107.
13. Athimulam, S., N. Lazik, and I. Bancos, *Low-Renin Hypertension*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2019. **48**(4): p. 701-715.
14. Bao, M., et al., *Genetic screening for monogenic hypertension in hypertensive individuals in a clinical setting*. J Med Genet, 2020. **57**(8): p. 571-580.
15. Boyden, L.M., et al., *Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities*. Nature, 2012. **482**(7383): p. 98-102.
16. Scholl, U.I., et al., *CLCN2 chloride channel mutations in familial hyperaldosteronism type II*. Nat Genet, 2018. **50**(3): p. 349-354.
17. Sutherland, D.J., J.L. Ruse, and J.C. Laidlaw, *Hypertension, increased aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone*. Canadian Medical Association journal, 1966. **95**(22): p. 1109-1119.
18. Lifton, R.P., et al., *A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension*. Nature, 1992. **355**(6357): p. 262-5.

19. Choi, M., et al., *K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension*. Science, 2011. **331**(6018): p. 768-72.
20. Scholl, U.I. and R.P. Lifton, *New insights into aldosterone-producing adenomas and hereditary aldosteronism: mutations in the K⁺ channel KCNJ5*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2013. **22**(2): p. 141-7.
21. Scholl, U.I., et al., *Recurrent gain of function mutation in calcium channel CACNA1H causes early-onset hypertension with primary aldosteronism*. Elife, 2015. **4**: p. e06315.
22. Funder, J.W., et al., *The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2016. **101**(5): p. 1889-1916.
23. Scholl, U.I., et al., *Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism*. Nat Genet, 2013. **45**(9): p. 1050-4.
24. Scholl, U.I., et al., *Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism*. Nature Publishing Group, 2013. **45**(9): p. 1050-1054.
25. Wilson, R.C., S. Nimkarn, and M.I. New, *Apparent mineralocorticoid excess*. Trends Endocrinol Metab, 2001. **12**(3): p. 104-11.
26. Ulick, S., et al., *A Syndrome of Apparent Mineralocorticoid Excess Associated with Defects in the Peripheral Metabolism of Cortisol**. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1979. **49**(5): p. 757-764.
27. Wilson, R.C., et al., *A mutation in the HSD11B2 gene in a family with apparent mineralocorticoid excess*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1995. **80**(7): p. 2263-2266.
28. Wiemuth, D., et al., *Interaction of serum- and glucocorticoid regulated kinase 1 (SGK1) with the WW-domains of Nedd4-2 is required for epithelial sodium channel regulation*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12163.
29. Yun, C.C., et al., *The serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 and the Na⁺/H⁺ exchange regulating factor NHERF2 synergize to stimulate the renal outer medullary K⁺ channel ROMK1*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(12): p. 2823-30.
30. Razzaghy-Azar, M., et al., *Apparent mineralocorticoid excess and the long term treatment of genetic hypertension*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2017. **165**(Pt A): p. 145-150.
31. Geller, D.S., et al., *Activating Mineralocorticoid Receptor Mutation in Hypertension Exacerbated by Pregnancy*. Science, 2000. **289**(July): p. 119-123.
32. Rafestin-Oblin, M.E., et al., *The severe form of hypertension caused by the activating S810L mutation in the mineralocorticoid receptor is cortisone related*. Endocrinology, 2003. **144**(2): p. 528-33.
33. Warnock, D.G., *Liddle syndrome: an autosomal dominant form of human hypertension*. Kidney Int, 1998. **53**(1): p. 18-24.
34. Salih, M., et al., *A Missense Mutation in the Extracellular Domain of α ENaC Causes Liddle Syndrome*. J Am Soc Nephrol, 2017. **28**(11): p. 3291-3299.
35. Hansson, J.H., et al., *Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome*. Nat Genet, 1995. **11**(1): p. 76-82.

36. Shimkets, R.A., et al., *Liddle's syndrome: Heritable human hypertension caused by mutations in the β subunit of the epithelial sodium channel*. *Cell*, 1994. **79**(3): p. 407-414.
37. Knight, K.K., et al., *Liddle's syndrome mutations increase Na^+ transport through dual effects on epithelial Na^+ channel surface expression and proteolytic cleavage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(8): p. 2805-8.
38. Enslow, B.T., J.D. Stockand, and J.M. Berman, *Liddle's syndrome mechanisms, diagnosis and management*. *Integr Blood Press Control*, 2019. **12**: p. 13-22.
39. Mayan, H., et al., *Hypercalciuria in Familial Hyperkalemia and Hypertension Accompanies Hyperkalemia and Precedes Hypertension: Description of a Large Family with the Q565E WNK4 Mutation*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2004. **89**(8): p. 4025-4030.
40. Wilson, F.H., et al., *Human Hypertension Caused by Mutations in WNK Kinases*. *Science*, 2001. **293**(5532): p. 1107-1112.
41. Moriguchi, T., et al., *WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(52): p. 42685-93.
42. Vitari, A.C., et al., *The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases*. *Biochem J*, 2005. **391**(Pt 1): p. 17-24.
43. Alessi, D.R., et al., *The WNK-SPAK/OSR1 pathway: master regulator of cation-chloride cotransporters*. *Sci Signal*, 2014. **7**(334): p. re3.
44. Yamauchi, K., et al., *Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004. **101**(13): p. 4690-4694.
45. Kahle, K.T., et al., *WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K^+ secretion*. *Nat Genet*, 2003. **35**(4): p. 372-6.
46. Wakabayashi, M., et al., *Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension*. *Cell Rep*, 2013. **3**(3): p. 858-68.
47. Ohta, A., et al., *The CUL3-KLHL3 E3 ligase complex mutated in Gordon's hypertension syndrome interacts with and ubiquitylates WNK isoforms: disease-causing mutations in KLHL3 and WNK4 disrupt interaction*. *Biochem J*, 2013. **451**(1): p. 111-22.
48. Delaloy, C., et al., *Multiple promoters in the WNK1 gene: one controls expression of a kidney-specific kinase-defective isoform*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(24): p. 9208-21.
49. Louis-Dit-Picard, H., et al., *Mutation affecting the conserved acidic WNK1 motif causes inherited hyperkalemic hyperchloremic acidosis*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2020. **130**(12): p. 6379-6394.
50. Louis-dit-picard, H., et al., *KLHL3 mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron*. *Nat Genet*, 2012. **44**(4): p. 456-60, S1-3.
51. Sakoh, T., et al., *A familial case of pseudohypoaldosteronism type II (PHA2) with a novel mutation (D564N) in the acidic motif in WNK4*. *Mol Genet Genomic Med*, 2019. **7**(6): p. e705.
52. Anglani, F., *Genotype-phenotype correlation in Gordon's syndrome: report of two cases carrying novel heterozygous mutations*. *J Nephrol*, 2021.
53. Bilginturan, N., et al., *Hereditary Brachydactyly Associated with Hypertension*. *Journal of Medical Genetics*, 1973. **10**(3): p. 253.

54. Naraghi, R., et al., *Neurovascular compression at the ventrolateral medulla in autosomal dominant hypertension and brachydactyly*. Stroke, 1997. **28**(9): p. 1749-54.
55. Maass, P.G., et al., *PDE3A mutations cause autosomal dominant hypertension with brachydactyly*. Nat Genet, 2015. **47**(6): p. 647-53.
56. Finkelstain, G.P., et al., *Comprehensive Genetic Analysis of 182 Unrelated Families with Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2011. **96**(1): p. E161-E172.
57. El-Maouche, D., W. Arlt, and D.P. Merke, *Congenital adrenal hyperplasia*. The Lancet, 2017. **390**(10108): p. 2194-2210.
58. Hinz, L., D. Pacaud, and G. Kline, *Congenital adrenal hyperplasia causing hypertension: an illustrative review*. Journal of Human Hypertension, 2018. **32**(2): p. 150-157.
59. Lenders, J.W., et al., *Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(6): p. 1915-42.
60. Wachtel, H. and L. Fishbein, *Genetics of pheochromocytoma and paraganglioma*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2021. **28**(3): p. 283-290.
61. Lurbe, E., et al., *2016 European Society of Hypertension guidelines for the management of high blood pressure in children and adolescents*. Journal of Hypertension, 2016. **34**(10): p. 1887-1920.
62. Seifarth, C., et al., *Influence of antihypertensive medication on aldosterone and renin concentration in the differential diagnosis of essential hypertension and primary aldosteronism*. Clinical Endocrinology, 2002. **57**(4): p. 457-465.
63. Etges, A., et al., *A Novel Homozygous KLHL3 Mutation as a Cause of Autosomal Recessive Pseudohypoaldosteronism Type II Diagnosed Late in Life*. Nephron, 2022: p. 1-11.
64. Mayan, H., et al., *Pseudohypoaldosteronism type II: marked sensitivity to thiazides, hypercalciuria, normomagnesemia, and low bone mineral density*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(7): p. 3248-54.
65. Kliuk-Ben Bassat, O., et al., *Familial Hyperkalemia and Hypertension (FHHT) and KLHL3: Description of a Family with a New Recessive Mutation (S553L) Compared to a Family with a Dominant Mutation, Q309R, with Analysis of Urinary Sodium Chloride Cotransporter*. Nephron, 2017. **137**(1): p. 77-84.
66. Sambharia, M., et al., *Familial hyperkalemic hypertension: hyperkalemia not hypertension defines dominant KLHL3 disease and may permit earlier recognition and tailored therapy*. J Nephrol, 2022.

5 Anhang

5.1 Fragebogen Hypertonie-Studie

Probenbegleitformular Hypertonie im Kindes- und Jugendalter

Arzt/Ärztin

Name:
Fachgebiet:
Klinik / Praxis:

Straße, Hausnummer:
PLZ, Ort:
Land:

Telefon:
Telefax:
E-Mail:

Patientendaten

Name, Vorname:

Geschlecht: männl. weibl.

Geburtsdatum (TT/MM/JJJJ): . . .

Ethnie (z.B. Italienisch, Marokkanisch, Japanisch):

Kontaktdaten der Eltern

Name(n):

Straße, Hausnummer:
PLZ, Ort:

Telefon:
E-Mail:

Klinische Diagnose

Diagnose, die zur Überweisung führt:

Patientenalter bei Diagnosestellung:
Jahre Monate

Blutdruck bei Diagnosestellung:

Datum (TT/MM/JJJJ): . . .
1. Messung: / mmHg
2. Messung: / mmHg

Frühere dokumentierte Blutdruckmessungen:

Datum (TT/MM/JJJJ): . . .
/ mmHg

Datum (TT/MM/JJJJ): . . .
/ mmHg

Aktuelle Symptome:

Ggf. Differentialdiagnosen:

24-Stunden-Blutdruckmessung:

24-h-Mittelwert:
/ mmHg

Tagesmittelwert:
/ mmHg

Nächtlicher Mittelwert:
/ mmHg

Symptome bei Diagnosestellung:

Nebendiagnosen:

Aktuelle Medikation:

Wirkstoff Dosis

Geburt und frühkindliche Entwicklung

Gestationsalter: Wochen

Perinatale Besonderheiten:

In welchem Alter konnte der/die Patient/in ...

...sitzen: Monate
...krabbeln: Monate
...laufen: Monate
...erste Worte sprechen: Monate

Apgar-Score (sofern bekannt):

Nabelarterienkatheter
 ja nein

Familienanamnese

Sind die Eltern miteinander verwandt?
 ja nein

Falls ja, wie ist der Verwandtschaftsgrad? (z.B. Cousins 1. Grades)

Anzahl der lebenden Geschwister:

Fehlgeburten und/oder vorzeitige Todesfälle in der Familie
 ja nicht bekannt

Falls ja, erläutern Sie dies bitte genauer (Verwandtschaftsgrad, ggf. Alter).

Gibt es in der Familie folgende Erkrankungen? Bei welchem/n Familienmitglied(ern)?

- Schlaganfall:
- Aneurysma:
- Früher Herzinfarkt:
- Frühe Hypertonie:

Sind weitere Familienmitglieder von Hypertonie betroffen?
 ja nein

Falls ja, welche (Name, verwandschaftl. Beziehung, Alter, Erkrankungsalter)?

Wären diese interessiert an der Studie teilzunehmen?
Falls ja, wie können wir sie kontaktieren?

Anamnese und Körperliche Untersuchung

Datum: . . .

Gewicht: kg % Perzentile
Größe: cm % Perzentile
BMI:

Blutdruck
Rechter Arm: / mmHg
Linker Arm: / mmHg

Rechtes Bein: / mmHg
Linkes Bein: / mmHg

Weitere Besonderheiten:

- Aortenisthmusstenose
- Entwicklungsverzögerung
- abdominelles Strömungsgeräusch
- Störungen der Sexualentwicklung
- Diabetes
- Dysmorphien (z.B. Brachydaktylie)
- Schwindel/Gleichgewichtsstörungen
- Hämaturie
- Hypokaliämie
- Kopfschmerzen
- exzessiver Lakritzkonsum
- Nykturie
- linksventrikuläre Hypertrophie
- Muskelschwäche
- Neurofibromatose
- Nierenerkrankung
- Ödeme
- Schilddrüsenerkrankung
- Schlafapnoe
- Schwitzen
- Tachykardie
- Transplantation (Organ)

Details:

andere:

keine

Laborwerte

Blutbild

	Wert	Einheit	Referenzbereich
Erythrozyten		<input type="checkbox"/> $\times 10^6/\mu\text{l}$ <input type="checkbox"/> $\times 10^{12}/\text{l}$	
Hämoglobin (Hb)		<input type="checkbox"/> g/dl <input type="checkbox"/> mmol/l	
Hämatokrit (Hkt)		%	
Leukozyten		<input type="checkbox"/> $\times 10^3/\mu\text{l}$ <input type="checkbox"/> $\times 10^9/\text{l}$	
Thrombozyten		<input type="checkbox"/> $/\mu\text{l}$ <input type="checkbox"/> $\times 10^9/\text{l}$	

Serum

	Wert	Einheit	Referenzbereich
Natrium		mmol/l	
Kalium		mmol/l	
Nüchtern-glucose		<input type="checkbox"/> mg/dl <input type="checkbox"/> mmol/l	
Kreatinin		<input type="checkbox"/> mg/dl <input type="checkbox"/> $\mu\text{mol}/\text{l}$	
eGFR		ml/min	

Harnstoff		<input type="checkbox"/> mg/dl <input type="checkbox"/> mmol/l	
Aldosteron		ng/l	
Renin		ng/l	
Plasma-Renin-Aktivität (PRA)		ng/ml/h	
Cortisol		mg/dl	
Plasma-Katecholamine		pg/ml	
Cholesterin (gesamt)		<input type="checkbox"/> mg/dl <input type="checkbox"/> mmol/l	
Triglyzeride		<input type="checkbox"/> mg/dl <input type="checkbox"/> mmol/l	

Urin

	Wert	Einheit	Referenzbereich
Aldosteron		<input type="checkbox"/> µg/die	
Gesamtprotein		<input type="checkbox"/> µg/min <input type="checkbox"/> mg/die	
Urin-Katecholamine		<input type="checkbox"/> µg/die	

Weitere Untersuchungsbefunde

Kardiologische Untersuchungsbefunde:

Wurde eine Echokardiographie durchgeführt?

ja nein

Falls ja, mit welchem Befund?

Wurde eine Nierenbiopsie durchgeführt?

ja nein

Falls ja, mit welchem Befund?

Nephrologische Untersuchungsbefunde:

Liegt eine Bildgebung der Niere oder der Nierengefäße vor?

ja nein

Falls ja, welche und mit welchem Befund?

Wurde ein Dexamethason-Hemmtest durchgeführt?

ja nein

Falls ja, mit welchem Befund?

Falls Duplexsonographie der Niere:

V_{max}: m/s

RI rechts:

RI links:

Liegt eine Bildgebung der Nebenniere vor?

ja nein

Falls ja, welche und mit welchem Befund?

Humangenetische

Untersuchungsbefunde

Liegt eine Karyotypisierung vor?

ja, und zwar:

nein

Durchgeführte Gendiagnostik:

Probeninformation

Abnahmedatum: . . .

Art der Proben:

Blut Speichel

Anzahl der Proben:

Haben andere Familienmitglieder an unserer Studie teilgenommen?

ja nein

Falls ja, bitte nennen Sie die Namen:

Bitten legen Sie ihrer Sendung folgendes bei:

Dieses Probenbegleitformular

mit Namen und Geburtsdaten versehene Blut- bzw. Speichelproben (auf dem Röhrchen beschriften). Bei kleinen Kindern genügen 1-3 ml Blut. Speichelkits versenden wir auf Anfrage.

Unterschriebene Einverständniserklärung/en

Laborbefunde im Original (Blutbild, Serumelektrolyte, Urinanalyse, Kreatinin, Harnstoff, Nüchtern-glucose, Renin, Aldosteron, Cortisol, Plasma-/Urinkatecholamine, Triglyzeride, Cholesterin)

zusätzliche klinische Informationen (Arztbriefe, ggf. Stammbaum)

Vielen Dank für Ihre Teilnahme!