

**Untersuchungen zur Bedeutung der
2-P-Domänen-Kaliumkanäle TASK1 und TASK3
für die Funktion der Nebenniere**

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
– BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Sascha Bandulik aus Regensburg
Januar 2009

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Februar 2006 bis Dezember 2008 unter der Anleitung von Herr Prof. Dr. med. Richard Warth am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am:

11.12.2008

Kolloquium am:

27.02.2009

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Herr Prof. Dr. med. Richard Warth

Prüfungsausschuss:

Herr Prof. Dr. med. Armin Kurtz (Vorsitzender)

Herr Prof. Dr. med. Richard Warth (1. Gutachter/Prüfer)

Herr Prof. Dr. med. Ernst Tamm (2. Gutachter/Prüfer)

Herr Prof. Dr. rer. nat. Stephan Schneuwly (3. Prüfer)

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Vorwort	4
1.2	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS)	4
1.3	Bedeutung von Aldosteron für die Pathogenese menschlicher Erkrankungen	6
1.4	Aufbau und Funktion der Nebenniere	7
1.5	Syntheseweg von Aldosteron	10
1.6	Degradation von Aldosteron	12
1.7	Regulation der Aldosteronfreisetzung in der Nebenniere	13
1.7.1	Einfluss von Angiotensin II	13
1.7.2	Einfluss von Plasma K^+	14
1.7.3	Konsequenzen der erhöhten zytoplasmatischen Calciumkonzentration	15
1.8	Mögliche Kandidaten für die K^+ -Hintergrundleitfähigkeit der Glomerulosazellen	17
1.9	Struktur, Eigenschaften und Vorkommen der K_2P -Kanäle TASK1 und TASK3	18
2	Zielsetzung	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Material	23
3.1.1	Geräte	23
3.1.2	Verbrauchsmaterial	23
3.1.3	Chemikalien, Arzneistoffe, Hormone	24
3.1.4	Enzyme, Kits	25
3.1.5	Oligonukleotide	25
3.1.6	Antikörper/Fluoreszenzfarbstoffe	26
3.1.7	Puffer und Lösungen	26
3.2	Methoden	29
3.2.1	Untersuchte Mäuse	29
3.2.2	Salzdiäten	29
3.2.3	Analyse von Elektrolyt-, Aldosteron- und Corticosteronkonzentration im Plasma	29
3.2.4	Blutdruckmessung	30
3.2.5	Reninaktivität im Plasma	30
3.2.6	Ussing-Kammer Experimente	30
3.2.7	Perfusionsfixierung mit Paraformaldehyd	31
3.2.8	Immunfluoreszenzfärbungen	32

3.2.9	Kastration und Hormonbehandlung.....	32
3.2.10	RNA Isolierung.....	32
3.2.11	Reverse Transkription (cDNA Synthese).....	33
3.2.12	Quantifizierung der Genexpression mittels Realtime PCR.....	33
3.2.13	Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot	34
3.2.14	Primärkultur und Patch-clamp Experimente von Nebennierenzellen	34
3.2.15	Statistik	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Untersuchung des adrenalen Phänotyps der <i>task1</i> ^{-/-} Mäuse.....	36
4.1.1	Konzentration von Aldosteron unter verschiedenen Salzdiäten	36
4.1.2	Primärer Hyperaldosteronismus in weiblichen <i>task1</i> ^{-/-} Mäusen	38
4.1.3	Hypokaliämie und ENaC-Aktivierung bei weiblichen <i>task1</i> ^{-/-} Mäusen.....	39
4.1.4	Hypertension bei weiblichen <i>task1</i> ^{-/-} Mäusen als Folge des Hyperaldosteronismus. 40	
4.1.5	Lokalisation der Aldosteron-produzierenden Zellen in der Nebennierenrinde	42
4.1.6	Einfluss von K ⁺ auf die Expression und Lokalisation der Aldosteronsynthese	44
4.1.7	Aufhebung des Hyperaldosteronismus durch Glukokortikoidbehandlung.....	46
4.1.8	Corticosteronsynthese in der Nebenniere.....	47
4.1.9	Alters- und geschlechtsabhängige Zonierung der Nebennierenrinde.....	47
4.1.10	Elektrophysiologische Eigenschaften der adrenokortikalen Zellen.....	51
4.2	Untersuchung des adrenalen Phänotyps der <i>task3</i> ^{-/-} Mäuse.....	53
4.2.1	Plasma-Aldosteron adulter <i>task3</i> ^{-/-} Mäuse unter verschiedenen Salzdiäten	53
4.2.2	Hyperaldosteronismus bei jungen <i>task3</i> ^{-/-} Mäusen	54
4.2.3	Expression und Lokalisation der Aldosteronsynthese in jungen <i>task3</i> ^{-/-} Mäusen	55
5	Diskussion.....	57
5.1	Hyperaldosteronismus und Bluthochdruck der <i>task1</i> ^{-/-} Mäuse.....	57
5.2	TASK1 determiniert die Zonierung des adrenalen Kortex.....	58
5.3	Dynamik der adrenokortikalen Zonierung.....	59
5.4	Bedeutung von TASK1 und TASK3 für die Regulation der Aldosteronsekretion.....	62
5.5	Regulation der Aldosteronsekretion bei adulten <i>task3</i> ^{-/-} Mäusen.....	64
5.6	Hyperaldosteronismus in jungen <i>task3</i> ^{-/-} Mäusen.....	64
5.7	Klinische Relevanz der Befunde	67
6	Zusammenfassung	68
7	Literaturverzeichnis	70
8	Abbildungsverzeichnis	81

9	Abkürzungsverzeichnis	82
10	Anhang.....	83
10.1	Bisherige Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	83
10.2	Lebenslauf.....	85
10.3	Eidesstattliche Erklärung.....	86
11	Danksagung.....	87

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts ist von elementarer Bedeutung für die Aufrechterhaltung des inneren Milieus von höheren Organismen. Dazu müssen die Aufnahme, Bildung und Ausscheidung von Wasser sowie die Aufnahme und Ausscheidung der Elektrolyte aufeinander abgestimmt werden. Außerdem unterscheiden sich die verschiedenen Flüssigkeitsräume (Kompartimente) des Körpers erheblich in ihrer Zusammensetzung. So überwiegen bei den Elektrolyten im Extrazellulärraum Na^+ , Cl^- und HCO_3^- , während wichtige osmotisch wirksame Bestandteile des intrazellulären Milieus K^+ , Phosphat und Proteine sind. Die Konstanthaltung dieser Verhältnisse ist unabdingbar für eine normale Zellfunktion und hängt von einer Vielzahl verschiedener Organfunktionen ab. Die präzise Abstimmung dieser Prozesse stellt eine der wichtigsten Leistungen des menschlichen Körpers dar.

1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS)

Bei Säugern nimmt das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) eine Schlüsselrolle ein, indem es die Homöostase von extrazellulärer Flüssigkeit und Blutdruck sicherstellt (Abb.1). Hauptmediator dieses Systems ist Angiotensin II (Ang II), welches durch eine Kaskade proteolytischer Aktivierungen entsteht. Am Anfang dieser Kaskade steht die Protease Renin, die in Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere gebildet wird. Die Reninsekretion wird durch verschiedene Faktoren ausgelöst: Ein Druckabfall im Bereich des Vas afferens des Glomerulums, ein Abfall der Salzkonzentration im Lumen des distalen Tubulus der Niere sowie eine Aktivitätssteigerung der sympathischen Nierennerven und Freisetzung von Katecholaminen führen zu einer Stimulation der Reninsekretion. Renin spaltet im Plasma aus dem Glykoprotein Angiotensinogen das Peptid Angiotensin I ab, welches durch das Angiotensin-I-Conversionsenzym (ACE) proteolytisch zu Ang II verkürzt wird. Ang II stimuliert in der Niere die Natriumresorption im proximalen Tubulus und erhöht über die Aktivierung der Ausschüttung des antidiuretischen Hormons (ADH) aus dem Hypophysenhinterlappen die Wasserrückresorption in den Sammelrohren. Des Weiteren bewirkt es ein gesteigertes Durstgefühl und einen vermehrten Salzappetit und fördert so die Wasser- und Salzzufuhr in den Körper. Weiterhin wirkt Ang II vasokonstriktorsch und erhöht damit den Widerstand im Gefäßsystem. Die wichtigste Wirkung von Ang II ist jedoch die Stimulation der

Aldosteronsekretion in der Nebennierenrinde. Neben Ang II ist die Konzentration von Kalium im Plasma ein wichtiger Regulator der Aldosteronfreisetzung. Im Aldosteronempfindlichen distalen Nephron der Niere und im distalen Kolon stimuliert das Mineralokortikoid Aldosteron die Na^+ -Retention und gleichzeitig auch die K^+ -Sekretion. Die vermehrte Na^+ -Rückresorption führt zu einem Anstieg des Extrazellulärvolumens und damit auch des Plasmavolumens. Durch diese Funktion ist Aldosteron maßgeblich an der Kontrolle des arteriellen Blutdrucks beteiligt.

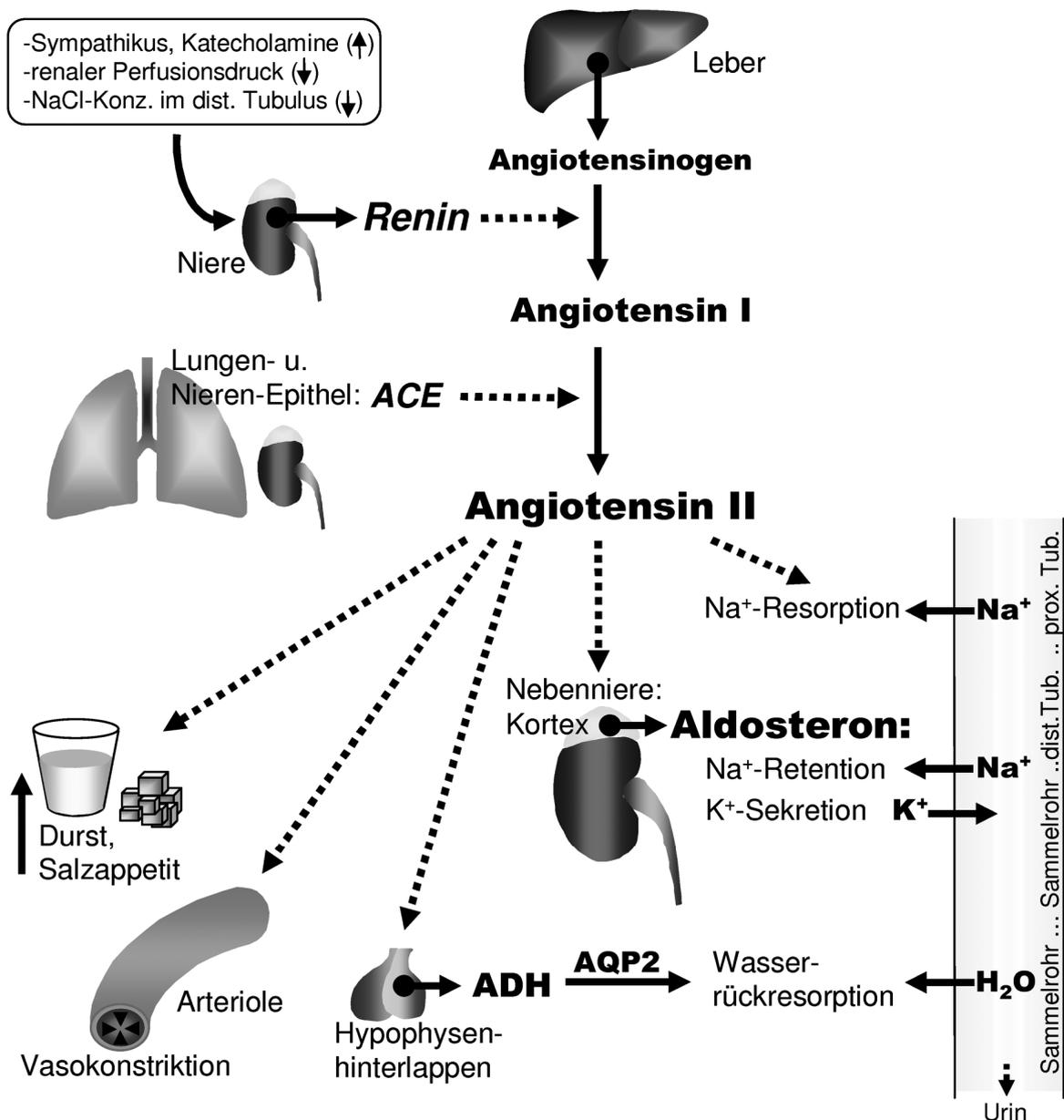


Abb. 1(↑): Schema des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS)

Das RAAS reguliert den Wasser- und Elektrolythaushalt und beeinflusst dadurch das Extrazellulärvolumen und den Blutdruck. Haupteffektor dieses Systems ist Angiotensin II (Ang II), welches in einer proteolytischen Kaskade gebildet wird: Von der Niere sezerniertes Renin spaltet aus Angiotensinogen, welches in der Leber gebildet wird, Angiotensin I ab. Daraus wird hauptsächlich in der Lunge und in der Niere Ang II durch das Angiotensin I-Conversionsenzym (ACE) abgespalten. Ang II verstärkt das Durstgefühl und den Salzappetit und bewirkt in den Arteriolen eine Vasokonstriktion. Ang II stimuliert die Ausschüttung des antidiuretischen Hormons (ADH) aus dem Hypophysenhinterlappen und bewirkt dadurch eine Wasserrückresorption im Sammelrohr der Niere, die von dem Kanalprotein Aquaporin-2 (AQP2) abhängt. In der Nebenniere stimuliert Ang II die Sekretion von Aldosteron, welches in den Aldosteron-empfindlichen Abschnitten der Nierentubuli (vor allem Verbindungsstück und Sammelrohr), sowie im distalen Kolon eine Na^+ -Reabsorption und gleichzeitige K^+ -Sekretion auslöst. In der Summe führen diese Prozesse zur Normalisierung oder Steigerung des extrazellulären Volumens und des Blutdrucks. (dist. Tub., (distaler Tubulus; prox. Tub., proximaler Tubulus)

1.3 Bedeutung von Aldosteron für die Pathogenese menschlicher Erkrankungen

Eine fehlerhafte Regulation der Aldosteronsekretion kann zum Hyperaldosteronismus führen, der für die Entstehung von 3-10% aller Fälle von Bluthochdruck verantwortlich gemacht wird (Nussberger, 2003; Calhoun, 2007; Makhanova, 2008). Außerdem spielt Aldosteron eine Rolle bei kardialer Fibrose, kardiovaskulärer Dysfunktion und der progressiven Nierenerkrankung (Ibrahim, 2003; Remuzzi et al., 2005). Die Bedeutung des Aldosterons als klinischer Risikofaktor wurde kürzlich durch mehrere klinische Studien hervorgehoben, in denen die positiven Effekte von Antagonisten des Mineralokortikoid-Rezeptors bei Herzinfarktpatienten nachgewiesen werden konnten (Aldosteron Evaluation Study (RALES); Eplerenone Heart failure and SURvival Study (EPHESUS); Chai and Danser, 2006). Die Entstehung eines Hyperaldosteronismus kann verschiedene Ursachen haben. Man unterscheidet den primären Hyperaldosteronismus, der mit einer normalen oder erniedrigten Reninsekretion einhergeht, vom sekundären Hyperaldosteronismus, der durch eine verstärkte Aktivierung des RAAS oder durch einen verminderten Aldosteronmetabolismus (z.B. bei Leberzirrhose) verursacht wird. Beim primären Hyperaldosteronismus liegt eine autonome Aldosteronsekretion vor, die nicht durch ACE-Inhibitoren oder AT1-Rezeptor-Antagonisten supprimierbar ist. Die Mehrzahl der Fälle des primären Hyperaldosteronismus wird durch Aldosteron-produzierende Adenome (35%) und bilaterale idiopathische Hyperplasien der Nebenniere (60%) verursacht (Young, 2007). Neben unilateralen Hyperplasien und Aldosteron-produzierenden Karzinomen der Nebenniere, gibt es eine seltene Form des primären Hyperaldosteronismus, die durch eine autosomal dominante Erbkrankheit verursacht wird. Dabei liegt ein Fusionsprodukt aus dem Gen der 11 β -Hydroxylase (CYP11B1) und dem Gen der Aldosteronsynthase

(CYP11B2) vor, das unter der Kontrolle von ACTH (adrenocorticotropes Hormon) steht (Lifton, 1992). Diese Form des Hyperaldosteronismus kann durch Behandlung mit Glukokortikoiden supprimiert werden. Bei einem Teil der Patienten mit Glukokortikoid-supprimierbarem Hyperaldosteronismus ist die Ursache unklar, da diesen Patienten dieses Fusionsgen fehlt (Fardella, 2000; Fardella, 2001).

Für eine zielgerichtete Prävention und Therapie ist es daher wichtig, die Ursachen einer Dysregulation der Aldosteronsekretion zu verstehen. Die folgenden Kapitel geben einen Überblick zum Aldosteronstoffwechsel in der Nebenniere und zu den bekannten Mechanismen, die eine regelgerechte Aldosteronsekretion ermöglichen. Die Untersuchung der Rolle bestimmter Kaliumkanäle (TASK1 und TASK3) für die Aldosteronhomöostase ist Gegenstand der hier vorgestellten Dissertation. Auf die genaue Zielstellung der Arbeit wird an späterer Stelle noch ausführlich eingegangen.

1.4 Aufbau und Funktion der Nebenniere

Die Nebenniere ist eine paarige endokrine Drüse, die sowohl histologisch als auch funktionell in verschiedene Zonen unterteilt werden kann (Abb. 2). Beim Menschen unterscheidet man die Nebennierenrinde, welche sich von außen nach innen in Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis aufteilt, vom Nebennierenmark. In der Zona glomerulosa wird hauptsächlich das Mineralokortikoid Aldosteron gebildet, welches die schon beschriebene Bedeutung für den Salz- und Wasserhaushalt hat. Das Glukokortikoid Cortisol stammt dagegen überwiegend aus der Zona fasciculata und zum Teil auch aus der Zona reticularis (Young, 2003). Cortisol dient als sogenanntes Stresshormon der Mobilisierung von Energiereserven und hemmt die Immunabwehr. In der Zona reticularis findet außerdem die Synthese von Androgenen statt. Im Nebennierenmark werden Adrenalin und Noradrenalin gebildet, deren Sekretion durch nervale Reize ausgelöst wird.

Hinsichtlich der Enzymausstattung der einzelnen Zonen gibt es Speziesunterschiede. So katalysiert das Enzym CYP17 in der Zona fasciculata und der Zona reticularis humaner Nebennieren die Umsetzung von Progesteron zu 17α -OH-Progesteron (und Pregnenolon zu 17α -OH-Pregnenolon), welches eine Vorstufe sowohl der Cortisol-, als auch der Androgensynthese ist (Abb. 3). In Nebennieren von adulten Ratten und Mäusen konnte man dagegen keine Expression von CYP17 nachweisen (Perkins, 1988; Le Goascogne, 1991). Man geht deshalb davon aus, dass in Nagern Corticosteron (und nicht Cortisol) das wichtigste Glukokortikoid ist und von dem Enzym CYP11B1 aus 11-Desoxycorticosteron

gebildet wird, welches auch das Substrat der Aldosteronsynthese (CYP11B2) ist (Payne, 2004). Außerdem kann man bei adulten Mäusen und Ratten aufgrund der fehlenden adrenalen Androgensynthese nur bedingt von einer funktionell abgegrenzten Zona reticularis sprechen (Keegan, 2002; Bielohuby, 2007). Bei einigen Spezies (unter anderem Kuh (Wada, 1985), Schaf (Boon, 1997) und Schwein (Sun, 1995)) wird der letzte Schritt der Aldosteron- bzw. Cortisolsynthese von ein und demselben Enzym katalysiert, so dass man in diesen Tieren die Unterscheidung von Zona glomerulosa und Zona fasciculata nicht anhand der Expression der Aldosteronsynthese treffen kann. Wie es dort zu der zonenspezifischen Ausprägung der jeweiligen Enzymaktivität (Aldosteronsynthese oder Cortisolsynthese) kommt, ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt.

Neben den oben beschriebenen Zonen gibt es in der Nebenniere Zellschichten, die möglicherweise an der dynamischen Anpassung der Nebennierenstruktur in Reaktion auf physiologische Reize oder an der postnatalen Entwicklung der Nebenniere beteiligt sind. Zwischen Zona glomerulosa und Zona fasciculata fand man Zellen, denen typische Marker reifer adrenokortikaler Zellen (Enzyme der Steroidsynthese) fehlten (Mitani, 2003). Es wurde von den Autoren spekuliert, dass aus dieser undifferenzierten Zellschicht Stammzellen hervorgehen, die zonenspezifisch migrieren und differenzieren können. Des Weiteren kennt man zwischen adrenalem Kortex und Medulla eine Zellschicht, die beim Menschen eine Rolle während der fetalen Nebennierenentwicklung spielt und nach der Geburt verschwindet (Mesiano, 1997). Bei Mäusen wurde eine analoge Struktur („Zone-X“) beschrieben, die sich allerdings erst nach der Geburt ausbildet und in männlichen Mäusen nach der Pubertät, sowie in weiblichen Mäusen während der ersten Schwangerschaft wieder verschwindet (Howard-Miller, 1928; Holmes, 1971). Neuere Befunde zeigten, dass Vorläuferzellen der Zone-X auch schon in der fetalen Nebenniere der Maus zu finden sind (Zubair, 2006). Die genaue Funktion dieser Zone-X ist bisher nicht aufgeklärt. In einer Arbeit (Hershkovitz, 2007) wurde spekuliert, dass die Zone-X möglicherweise an der Inaktivierung oder Modifizierung von aus dem Kortex stammenden Hormonen beteiligt ist. Überhaupt ist die Nebenniere außerordentlich regenerationsfähig. Entfernt man von Nebennieren aus Ratten bis auf die Kapsel und die unmittelbar anliegenden kortikalen Zellschichten das restliche Zellmaterial, so können sich diese Nebennieren innerhalb kurzer Zeit unter Erlangung der normalen Histologie und Funktion regenerieren (Perrone, 1986). In anderen Experimenten entwickelte sich bei Mäusen, denen zuvor die Nebennieren entfernt wurden, durch Transplantation von immortalisierten

adrenokortikalen Zellen ein funktionelles Gewebe mit der typischen Struktur der Nebennierenrinde (Thomas, 1997).

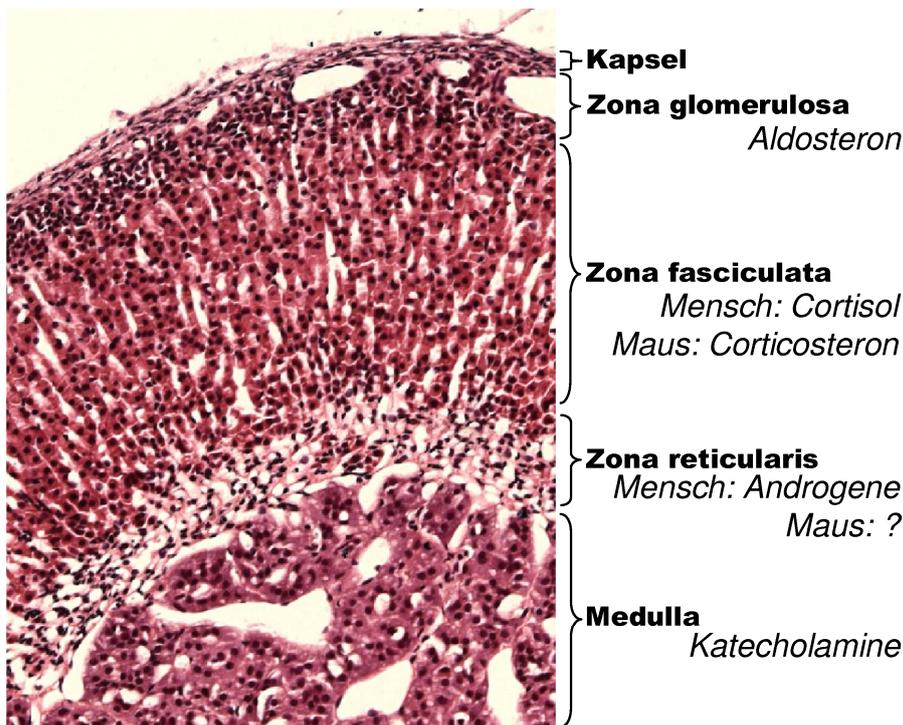


Abb. 2: Histologische und funktionelle Zonierung der Nebenniere

Dargestellt ein HE-Schnitt einer Nebenniere der Maus. Die Maus wurde zuvor mit PFA perfundiert und die fixierte Nebenniere anschliessend in Paraffin eingebettet. Von außen nach innen folgen auf die Organkapsel die drei Zonen der Nebennierenrinde: In der Zona glomerulosa findet die Aldosteronsynthese statt. In der Zona fasciculata der Maus wird Corticosteron synthetisiert, während beim Menschen Cortisol das wichtigste Glukokortikoid ist. In der Zona reticularis des Menschen werden Androgene (und teilweise auch Cortisol) gebildet. Aufgrund der fehlenden adrenalen Expression des Enzyms CYP17, findet in der Zona reticularis der Maus dagegen keine Androgensynthese statt. Das Innere der Nebenniere besteht aus der Medulla, in der die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin gebildet werden.

1.5 Syntheseweg von Aldosteron

Die Biosynthese der Steroidhormone ist auf zwei Zellkompartimente (Mitochondrium und Endoplasmatisches Reticulum) aufgeteilt und wird durch membrangebundene Cytochrom-P450-Enzyme (CYP) sowie durch Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSD) katalysiert. Die für die verschiedenen Reaktionen der CYP-Enzyme benötigten Reduktionäquivalente (Elektronen) stammen aus NADPH und werden von akzessorischen Transportproteinen auf die CYP-Enzyme übertragen, da diese jeweils nur ein Elektron aufnehmen, NADPH aber je zwei Elektronen zur Verfügung stellt (White, 1994). Die CYP-Enzyme gehören zu einer Familie von Häm-haltigen Proteinen, die ihren Namen aufgrund der Eigenschaft erhielten, nach *in vitro*-Komplexierung mit CO ein Absorptionsmaximum bei 450 nm zu haben. Ausgangspunkt der Aldosteronsynthese in der Zona glomerulosa der Nebenniere ist, wie auch bei allen anderen Steroidhormonen, das Cholesterin, welches durch Cholesterinesterasen aus Lipidtröpfchen freigesetzt wird. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Steroidhormonsynthese ist der Transport des Cholesterins von der äußeren zur inneren mitochondrialen Membran durch das „steroidogenic acute regulating“ (StAR) Protein. Für die Rate der Aldosteronsynthese ist weiterhin die Expression der Aldosteronsynthase entscheidend. Cholesterin wird an der Matrixseite der inneren mitochondrialen Membran durch Seitenkettenabspaltung und Einführung einer Ketogruppe zu Pregnenolon umgewandelt (Abb. 3). Das Pregnenolon gelangt in das Endoplasmatische Reticulum und wird dort über die Zwischenstufe Progesteron zu 11-Desoxycorticosteron umgesetzt. Dieses wird im Mitochondrium von der Aldosteronsynthase (CYP11B2) in einer dreistufigen Reaktion zunächst zu Corticosteron und dann zu 18-Hydroxycorticosteron hydroxyliert, woraus im letzten Schritt durch Oxidation schließlich Aldosteron entsteht (Lisurek, 2004). Die Zwischenprodukte der Aldosteronsynthesereaktion werden dabei nicht freigesetzt und fungieren, wenn sie exogen zugesetzt werden, nicht als Substrat dieser Reaktion (White, 1994).

Neben der bekannten Expression in der Nebenniere konnte die Aldosteronsynthase (sowie CYP11B1) auch in verschiedenen anderen Geweben nachgewiesen werden, so z.B. im Gehirn (Ozaki, 1991; Stromstedt, 1995; MacKenzie, 2000) und Herz (Rudolph, 2000; Yoshimura, 2002) von Ratten. Von den Autoren wurde spekuliert, dass Aldosteron im Gehirn Effekte auf die langfristige Blutdruckkontrolle, sowie auf Durstgefühl und Salzappetit haben könnte. Im Gefäßsystem beeinflusst die Expression der Aldosteronsynthase möglicherweise die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen.

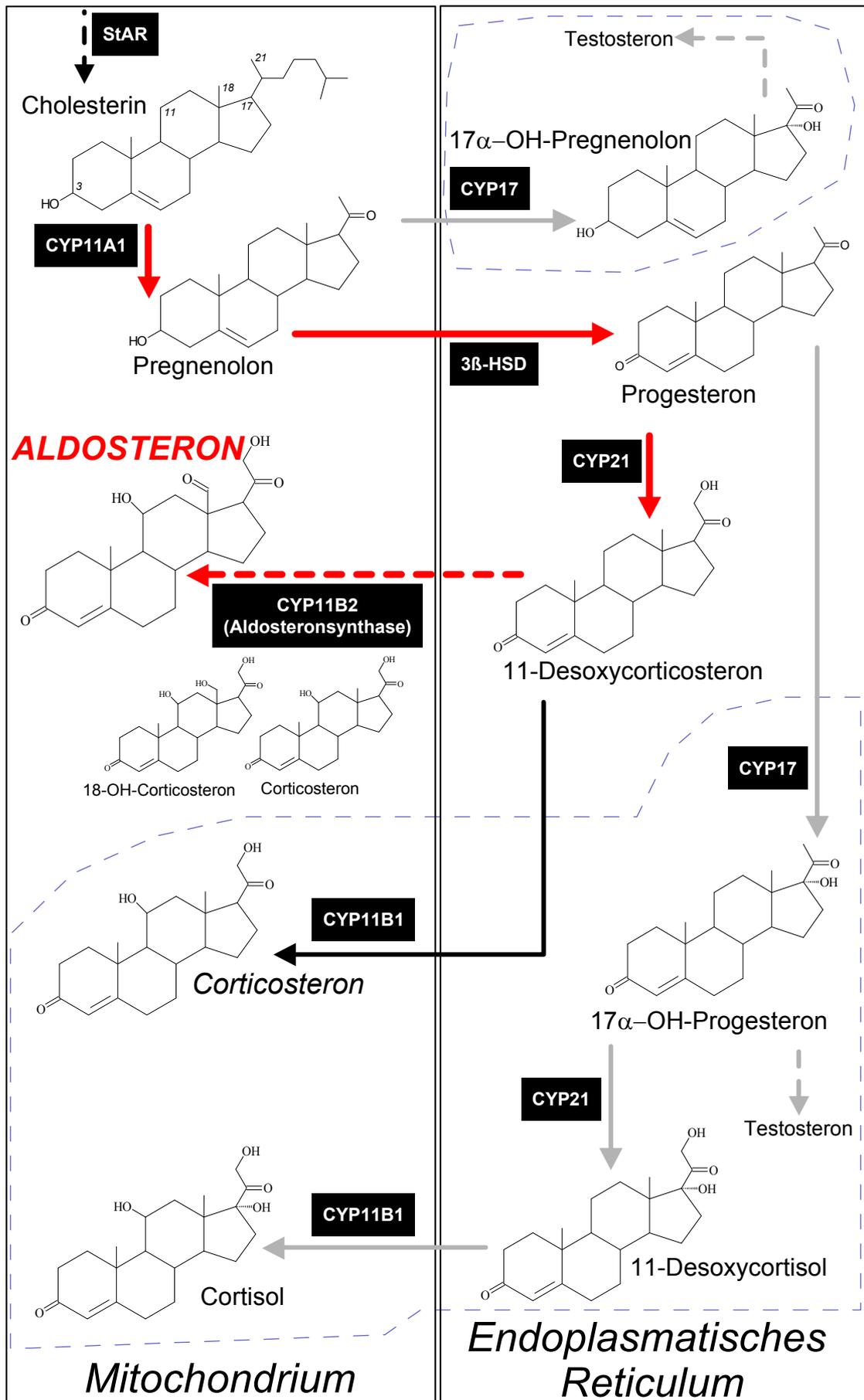


Abb. 3(↑): Stellung der Aldosteronsynthese im Stoffwechsel der Nebenniere

Die Synthese der Steroidhormone in der Nebennierenrinde wird durch membrangebundene Cytochrom-P450-Enzyme (CYP) und Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSD) katalysiert. Die einzelnen Reaktionsschritte finden entsprechend der Expression der Enzyme im Mitochondrium oder im Endoplasmatischen Reticulum (ER) statt. Die CYP-Enzyme benötigen NADPH als Elektronendonator für die Reduktion des Sauerstoffs, welcher auf das Substrat zur Bildung einer Hydroxylgruppe übertragen wird. Für die Reaktion der HSD wird dagegen NAD^+ als Elektronenakzeptor verwendet. Ausgangspunkt der Steroidhormonsynthese ist Cholesterin, welches durch das „steroidogenic acute regulating“ (StAR)-Protein von der äußeren zur inneren mitochondrialen Membran transportiert wird. Aus Cholesterin wird durch CYP11A1 Pregnenolon gebildet, dieses im ER durch $3\beta\text{HSD}$ zu Progesteron umgesetzt und daraus schließlich durch CYP21 11-Desoxycorticosteron (11-DOC) gebildet. Welche weiteren Reaktionsschritte folgen, hängt von der Enzymausstattung der jeweiligen Zelle ab: Die Zellen der Zona glomerulosa exprimieren die Aldosteronsynthase (CYP11B2) und können dementsprechend aus 11-DOC in einer dreistufigen Reaktion Aldosteron bilden. In den Zellen der Zona fasciculata findet man dagegen die 11β -Hydroxylase (CYP11B1), welche 11-DOC zu Corticosteron (als Haupt-Glukokortikoid der Maus) umsetzt. Beim Menschen katalysiert CYP11B1 dagegen hauptsächlich die Synthese von Cortisol. Die Cortisolsynthese hängt von der CYP17-Expression ab, welche in der Nebenniere der Maus fehlt. Aus diesem Grund findet in der Maus auch keine adrenale Androgensynthese statt. (Reaktionen, die nicht in der Zona glomerulosa ablaufen, sind in der Abbildung mit gestrichelter Linie eingekreist). Darstellung nach: (Lisurek, 2004).

1.6 Degradation von Aldosteron

Damit hydrophobe Substanzen den Körper über die Niere oder über die Galle verlassen können, müssen sie vorher in wasserlösliche Derivate transformiert werden. So wird Aldosteron in der Leber zunächst zu Tetrahydroaldosteron reduziert, dann mit Glucuronsäure verestert und in dieser Form mit dem Urin (und zum Teil mit der Gallenflüssigkeit) ausgeschieden. Dementsprechend hängt die Aldosteronkonzentration im Plasma von den Geschwindigkeiten der Aldosteronsekretion und der Aldosteron-degradation, sowie vom möglichen Austausch mit nicht-plasmatischen Kompartimenten ab. Die Umwandlung von Aldosteron in der Leber verläuft sehr effektiv, so dass eine Leberpassage ausreicht, um das Aldosteron nahezu vollständig in wasserlösliche Derivate zu transformieren. Entsprechend beträgt die Halbwertszeit von Aldosteron im Blut nur 15 Minuten. Ein Teil des Aldosterons wird auch direkt in der Niere glucuronidiert. Aldosteronderivate, die über die Galle in den Darm gelangen, werden dort von Bakterien weiter modifiziert und in dieser Form teilweise wieder reabsorbiert (Henriksen, 1991).

1.7 Regulation der Aldosteronfreisetzung in der Nebenniere

Da Steroid-produzierende Zellen die Hormone nicht speichern, sondern durch Diffusion freisetzen, hängt die Rate der Hormonsekretion hauptsächlich von der Neusynthese des Steroids ab. Die Steroidhormonsynthese wird durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert. Die wichtigsten physiologischen Stimuli der Aldosteronsynthese und damit auch der Aldosteronsekretion in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde sind Angiotensin II (Ang II), eine hohe Konzentration von Kalium im Plasma und zu einem kleineren Teil auch ACTH. Letztlich führen sowohl Ang II, als auch erhöhtes Plasma K^+ zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration, die eine gesteigerte Aldosteronsekretion zur Folge hat (Abb. 4). Die cAMP-vermittelte Stimulation der Aldosteronsekretion durch ACTH hängt ebenfalls von einem Ca^{2+} -Einstrom in die Glomerulosazelle ab (Tremblay, 1991). Das atriale natriuretische Peptid (ANP) ist der wichtigste Inhibitor der Aldosteronsekretion und antagonisiert die durch eine Ca^{2+} -Erhöhung aktivierten Mechanismen (u.a. durch Inhibierung der StAR-Expression und durch Aktivierung von BK-Kaliumkanälen) (Ganz, 1994; Cherradi, 1998). Im Folgenden wird näher auf die wichtigsten Stimuli (Ang II, Plasma K^+) der Aldosteronsekretion eingegangen.

1.7.1 Einfluss von Angiotensin II

Die Bindung von Angiotensin II (Ang II) an AT1 Rezeptoren aktiviert, vermittelt über gekoppelte G-Proteine ($G_{q/11}$), die Phospholipase C (PLC_{β}). Dieses membrangebundene Enzym spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) und setzt dabei die second messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) frei. IP_3 aktiviert den IP_3 -Rezeptor, der als Ca^{2+} -Kanal eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (Endoplasmatisches Reticulum, ER) bewirkt. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration induziert schließlich über eine weitere Kaskade (siehe unten) die Aldosteronsynthese und damit auch die Aldosteronsekretion. Das in der PLC-Reaktion freigesetzte DAG aktiviert verschiedene Isoformen der Proteinkinase C (PKC) und hat dadurch eine inhibitorische Wirkung auf die Aldosteronsynthese (LeHoux, 2006). Diese gleichzeitige Aktivierung (über IP_3) und Inhibierung (über DAG) durch Ang II dient vermutlich dazu, eine überschießende Aldosteronfreisetzung zu verhindern. Der schnellen Phase der Aktivierung der Aldosteronsekretion durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER folgt eine länger anhaltende Phase, die von einer Membrandepolarisation und der Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran abhängt. Ang II hemmt in den Glomerulosazellen die Na^+/K^+ -ATPase (Hajnoczky, 1992) und verschiedene K^+ -Kanäle (darunter TASK-Kanäle) und löst so die Depolarisation aus, die wiederum

spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle aktiviert. Gleichzeitig steigert Ang II auch direkt die Aktivität dieser Ca^{2+} -Kanäle, indem es (G-Protein vermittelt) deren Spannungsabhängigkeit zu negativeren Werten verschiebt, so dass die Kanäle schon bei geringerer Depolarisation öffnen. Der durch Ang II induzierte Influx von extrazellulärem Ca^{2+} hängt hauptsächlich von T-Typ Ca^{2+} -Kanälen ab, während Ang II-Effekte auf L-Typ Ca^{2+} -Kanäle einen Einfluss auf die IP_3 -abhängige Ca^{2+} -Freisetzung zu haben scheinen (Spat, 1994; Spat und Hunyady, 2004).

1.7.2 Einfluss von Plasma K^+

Ein Anstieg der Kaliumkonzentration im Plasma stimuliert - im Gegensatz zu Ang II - nur die anhaltende Phase der Aldosteronsekretion, die durch den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle ausgelöst wird (Lotshaw, 2001). Die Glomerulosazelle ist ein besonderer Sensor der extrazellulären Kaliumkonzentration. Ein Anstieg des extrazellulären K^+ um etwa 1 mM ist ausreichend, die Rate der Aldosteronsekretion zu verdoppeln; die maximale Sekretion wird bei ca. 8 mM extrazellulärem K^+ erreicht (Spat, 2004). Die Grundlage für diese einzigartige Empfindlichkeit gegenüber der Kaliumkonzentration im Plasma ist eine sehr hohe Hintergrundleitfähigkeit für K^+ , welche das Membranpotential der Glomerulosazelle strikt dem Gleichgewichtspotential für K^+ folgen lässt. Bei niedriger extrazellulärer Kaliumkonzentration liegt das Ruhemembranpotential der Glomerulosazelle bei -80 mV (in einigen Arbeiten wurden auch Werte < -80 mV gemessen). Ein kleiner Anstieg des extrazellulären K^+ führt zu einer relativ geringen Membrandepolarisation. Diese Depolarisation ist aber ausreichend, um spannungsabhängige T-Typ Ca^{2+} -Kanäle zu aktivieren, da die Aktivierungsschwelle dieser Kanäle zwischen -80 und -70 mV liegt (Szabadkai, 1999; Lotshaw, 2001). Dagegen werden L-Typ Ca^{2+} -Kanälen erst bei etwa -57 mV aktiviert, weshalb sie unter physiologischen K^+ -Konzentrationen nicht wesentlich zum Ca^{2+} -Influx beitragen können (Varnai, 1998). Die initiale Aktivierung der T-Typ Ca^{2+} -Kanäle durch die relativ geringe Membrandepolarisation wird durch mehrere Mechanismen verstärkt: Über die Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Protein Kinase II (CaMKII) aufgrund der erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wird die Aktivierungsschwelle der T-Typ Ca^{2+} -Kanäle herabgesetzt (Barrett, 2000). Man weiß außerdem, dass die erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentration eine Zellschwellung verursachen kann, die ebenfalls zu einer Sensibilisierung der T-Typ Ca^{2+} -Kanäle gegenüber einer Depolarisation führt (Makara, 2003). In der Summe generieren relativ kleine Änderungen der extrazellulären K^+ -Konzentration, in Abhängigkeit von der hohen

K^+ -Hintergrundleitfähigkeit und den genannten Verstärkungsmechanismen in den Glomerulosazellen ein Ca^{2+} -Signal, das ausreicht, die Aldosteronsekretion zu stimulieren.

1.7.3 Konsequenzen der erhöhten zytoplasmatischen Calciumkonzentration

Der Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration $[Ca^{2+}]_z$, ausgelöst durch Ang II oder eine hohe extrazelluläre K^+ -Konzentration, stimuliert verschiedene Faktoren, die gemeinsam eine erhöhte Aldosteronsekretion zur Folge haben:

1. Die $[Ca^{2+}]_z$ -Erhöhung induziert die Expression der Aldosteronsynthase (CYP11B2). Vermittelt wird dieser Effekt durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Protein Kinase I (CaMKI), welche Transkriptionsfaktoren (ATF-1, CREB) phosphoryliert, die an bestimmte Regionen (cAMP-response Element, CRE) in der Promotorregion des CYP11B2- und auch des CYP11B1-Gens binden (Condon, 2002). Für die vollständige Induktion der CYP11B2-Transkription sind zusätzliche Faktoren nötig, die andere regulatorische Sequenzen (Ad-5, NBRE-1) des CYP11B2-Gens erkennen. Der Aktivierungsmechanismus dieser Transkriptionsfaktoren (NGFIB, NURR1) ist bisher noch unklar (Bassett, 2004).

2. Zusätzlich zur Induktion der Aldosteronsynthase verursacht die Erhöhung des $[Ca^{2+}]_z$ einen Anstieg der Cholesterinkonzentration an der inneren mitochondrialen Membran und begünstigt so die Verfügbarkeit von Cholesterin als Vorstufe der Steroidsynthese (Cherradi, 1996; Cherradi, 1997). Vermittelt wird dieser Effekt des $[Ca^{2+}]_z$ im Wesentlichen durch eine Induktion des steroidogenic acute regulating (StAR) Proteins, welches den Transport von Cholesterin zwischen der äußeren und inneren mitochondrialen Membran katalysiert (Lin, 1995) und auch durch ACTH induziert wird (Stocco, 1996). Indirekt führt eine Erhöhung des $[Ca^{2+}]_z$ über die Stimulation der cAMP-Bildung zusätzlich zu einer Aktivierung des StAR Proteins (Tait, 1999).

3. Außerdem gibt es Hinweise, dass der Anstieg des $[Ca^{2+}]_z$ auch die intramitochondriale Ca^{2+} -Konzentration erhöht (Brandenburger, 1996). Es wurde spekuliert, dass dadurch die Verfügbarkeit von NADPH stimuliert wird, welches Kofaktor in mehreren Reaktionsschritten der Aldosteronsynthese ist (Spat, 2004).

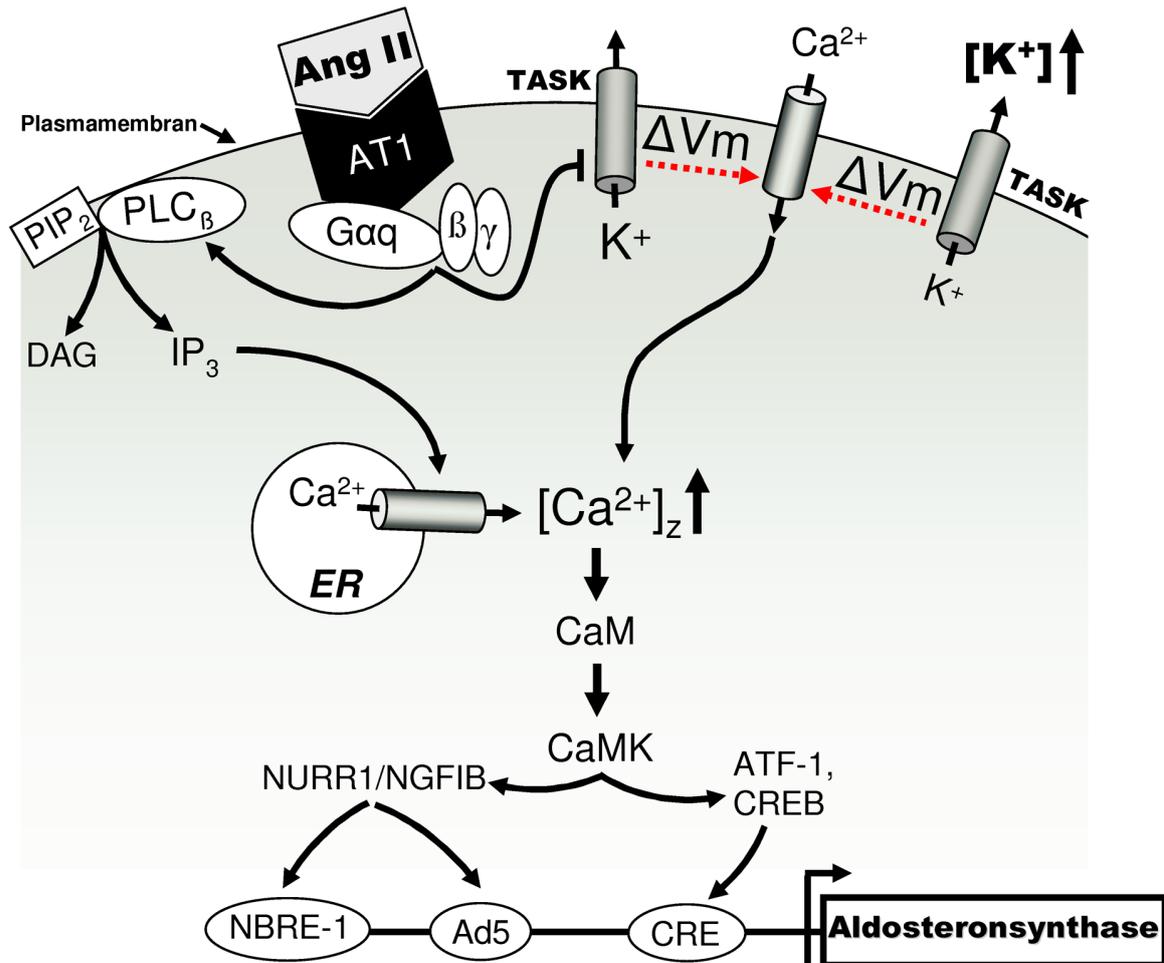


Abb. 4: Regulation der Aldosteronsekretion

Dargestellt ist ein vereinfachtes Modell der Wirkung von Angiotensin II (Ang II) und erhöhter Plasma K⁺-Konzentration auf die Transkription der Aldosteronsynthese in den Glomerulosazellen der Nebenniere. Die Plasmamembran der Glomerulosazellen ist unter Ruhebedingungen aufgrund einer sehr hohen K⁺-Leitfähigkeit hyperpolarisiert. Eine Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration führt über eine Verschiebung des K⁺-Gleichgewichtspotentials zur Depolarisation (ΔV_m), welche ihrerseits spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle aktiviert und so den Einstrom von Ca²⁺ in die Zelle ermöglicht. Auch Ang II führt zu einer Depolarisation: nach Bindung an seinen Rezeptor (AT1) hemmt es Kaliumkanäle vom TASK-Typ (beim Rind: TREK1) und sensitiviert die spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle gegenüber der Depolarisation. Darüber hinaus bewirkt Ang II eine G-Protein-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C_β (PLC_β), welche über Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) zur Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern (Endoplasmatisches Retikulum, ER) führt. Sowohl eine Erhöhung der Plasma K⁺-Konzentration als auch Ang II bewirken also eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, wodurch über Calmodulin und Calmodulin-abhängigen Kinasen (CaMK) spezifische Transkriptionsfaktoren (NURR1/NGFIB, ATF-1 und CREB) aktiviert werden. Die Folge ist eine erhöhte Transkription der Aldosteronsynthese. DAG (Diacylglycerin)

1.8 Mögliche Kandidaten für die K⁺-Hintergrundleitfähigkeit der Glomerulosazellen

Wie schon beschrieben wurde, reagieren die Glomerulosazellen höchst empfindlich auf Änderungen der K⁺-Konzentration im Plasma, wobei diese Reaktion von einer hohen K⁺-Hintergrundleitfähigkeit abhängt. Welche K⁺-Kanäle in welchem Maße zur Depolarisation der Glomerulosazellen in Abhängigkeit von der Plasma K⁺-Konzentration und zur Stimulation der Aldosteronsekretion tatsächlich beitragen, ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Arbeiten an genetisch modifizierten Mäusen verweisen auf eine Rolle der spannungsabhängigen KCNE1/KCNQ1 Kanäle bei der Regulation der Aldosteronsekretion (Arrighi, 2001). Des Weiteren wurden Ca²⁺-aktivierte MaxiK-Kanäle als limitierender Faktor der Aldosteronsekretion vorgeschlagen (Sausbier, 2005). Allerdings sind diese Kanäle im Ruhezustand nicht konstitutiv geöffnet, sondern scheinen eher von Bedeutung für die Repolarisation des Membranpotentials nach einer Stimulation und Depolarisation der Glomerulosazellen zu sein. Deshalb müssen andere K⁺ Kanäle für die Hintergrundleitfähigkeit verantwortlich sein, die jene besondere Empfindlichkeit der Glomerulosazellen gegenüber der extrazellulären Kaliumkonzentration ermöglicht.

Weitere elektrophysiologische Untersuchungen der Glomerulosazellen haben die Bedeutung der im nächsten Kapitel beschriebenen „leak-type“ K⁺-Kanäle der 2-P-Domänen (K2P) Familie gezeigt. In bovinen Glomerulosazellen scheint der K2P-Kanal TREK1 einen wesentlichen Einfluss auf das Membranpotential zu haben (Enyeart, 2004). Dagegen wurde berichtet, dass die K2P-Kanäle TASK1 und in stärkerem Maße TASK3 die dominierenden Kanäle der Hintergrundleitfähigkeit in Glomerulosazellen von Ratten sind und durch Ang II sowie weitere Ca²⁺-mobilisierende Agonisten gehemmt werden können (Czirjak, 2000; Czirjak, 2002b). Unsere eigene Arbeit (Heitzmann, 2008), die hier vorgestellt wird, sowie die Arbeit einer anderen Gruppe (Davies, 2008), die nach unserer Arbeit erschienen ist, untermauern die Bedeutung der TASK-Kanäle und zeigen, welche Konsequenzen ein Knockout dieser Kanäle für die Funktion der Nebenniere hat. Im folgenden Kapitel wird näher auf TASK1 und TASK3 als Vertreter der Familie der K2P-Kaliumkanäle eingegangen.

1.9 Struktur, Eigenschaften und Vorkommen der K2P-Kanäle TASK1 und TASK3

a) Struktur

Kaliumkanäle sind ubiquitär exprimierte Membranproteine und bilden die größte Familie von Ionenkanälen. Diese Kanäle haben wesentlichen Einfluss auf die Ausbildung und Modulation des Membranpotentials der Zelle und bestimmen dadurch eine Vielzahl physiologischer Prozesse. Aufgrund ihrer Struktur kann man Kaliumkanäle in 3 große Familien einteilen: Zur ersten Familie gehören spannungsaktivierte und Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanäle, deren Struktur durch 6 Transmembrandomänen und eine Poren-bildende Domäne gekennzeichnet ist. Die zweite Familie beinhaltet einwärtsgerichtete Kaliumkanäle, sowie ATP-aktivierte und G-Protein-gekoppelte Kaliumkanäle, welche aus jeweils 2 Transmembrandomänen und einer Poren-bildenden Domäne bestehen.

Die dritte Familie, zu der TASK1 und TASK3 gezählt werden (Duprat, 1997; Kim, 2000), ist die erst vor einiger Zeit beschriebene Gruppe der 2-P-Domänen Kaliumkanäle (K2P). Proteine dieser Familie bestehen aus 300-500 Aminosäuren und weisen als gemeinsames Strukturmerkmal 4 Transmembrandomänen (M1-M4) und 2 Poren-bildende Domänen (P1 und P2) auf (Lesage, 2000). Proteine anderer Kaliumkanalfamilien haben dagegen nur eine Poren-bildende Domäne und stellen als Tetramere einen funktionellen Kanal dar (Yang, 1995; Doyle, 1998). Damit sind jeweils 4 P-Domänen an der Ausbildung der Kanalpore und des Selektivitätsfilters für Kalium beteiligt. Für die Kanäle der K2P-Familie wurde deshalb eine Dimerisierung von jeweils 2 Untereinheiten zu einem funktionellen Kanal mit ebenfalls insgesamt 4 P-Domänen postuliert (Abb.5). TWIK1 (Tandem of P domains in a Weak Inwardly rectifying K^+ channel) (Lesage, 1996a) war der erste Vertreter dieser Familie, der in Säugern gefunden wurde. Inzwischen kennt man 15 verschiedene Mitglieder der K2P-Familie. TWIK1 bildet, wie auch weitere K2P-Kanäle, Homodimere, welche durch Interaktion zweier Untereinheiten in einer amphiphatischen α -Helix („self interacting domain“, SID) mit gleichzeitiger Disulfidbrückenbildung aufgebaut werden. (Lesage, 1996b; Lopes, 2001). Dagegen wurden für TASK1 und TASK3 neben der Bildung von Homodimeren auch funktionelle Heterodimere nachgewiesen. So konnte eine Arbeitsgruppe (Czirjak und Enyedi, 2002a) durch gleichzeitiger Expression von TASK1 und TASK3 bzw. Expression eines Tandem-Konstrukts in *Xenopus laevis* Oocyten K^+ -Kanäle nachweisen, deren Eigenschaften bezüglich ihrer Regulation (pH-Wert Empfindlichkeit, Ruthenium-Red-Unempfindlichkeit, Hemmung durch Ang II) zwischen denen der jeweils einzeln exprimierten Kanäle lagen. Eine andere Arbeitsgruppe (Kang,

2004) konnte diese Befunde zum Teil bestätigen, fand aber heraus, dass die elektrischen Kanaleigenschaften (Einzelkanalleitfähigkeit, Kinetik des Stroms) der TASK1/TASK3-Heterodimere nahezu denen der TASK3-Homodimere entsprachen. Über die funktionelle Relevanz der Heteromerbildung von TASK1 und TASK3 *in vivo* herrscht noch Unklarheit. Möglicherweise trägt die Interaktion von TASK1 und TASK3 zur alters- und gewebespezifischen Modulation der Kanalfunktion bei. Die Aminosäuresequenzen der vollständigen TASK1- und TASK3-Proteine sind zu 54% identisch und zu 64% ähnlich (konservativer Aminosäureaustausch mit eingeschlossen). Betrachtet man dagegen (mit Ausnahme von M3) nur die Sequenzen der Transmembrandomänen und der beiden Porenbildenden Domänen, so sind diese bei TASK1 und TASK3 nahezu vollständig identisch (Kim, 2000).

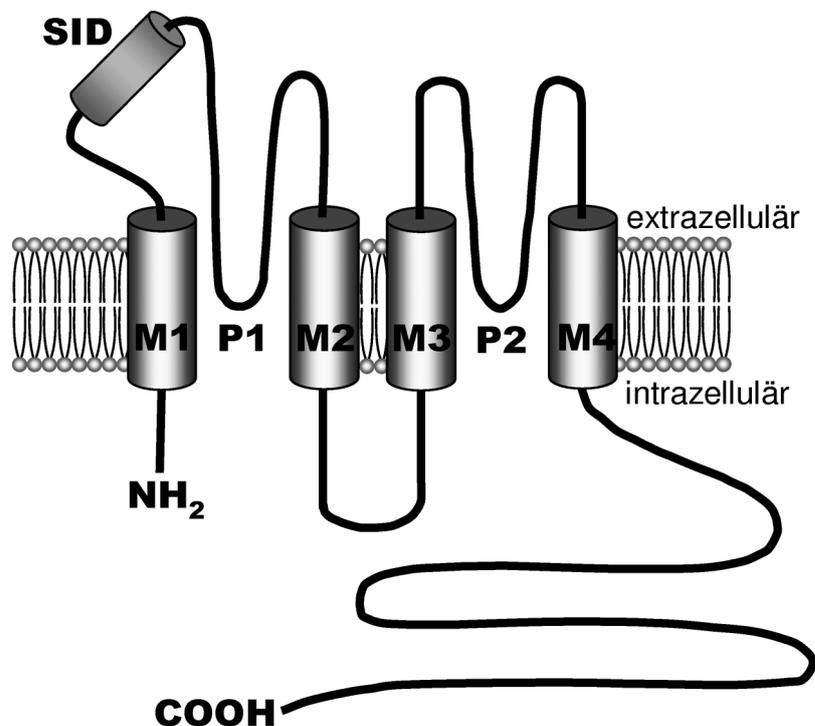


Abb. 5: Struktur von 2-P-Domänen Kaliumkanälen

Dargestellt ist die postulierte Membrantopologie einer Untereinheit von 2-P-Domänen Kaliumkanälen. Diese Untereinheit besteht aus vier Transmembrandomänen (M1-M4) und zwei Porenbildenden Domänen (P1, P2). Ein funktioneller Kanal wird vermutlich durch Dimerisierung zweier Untereinheiten gebildet, die über eine extrazelluläre Domäne („self interacting domain“, SID) miteinander interagieren. Darstellung nach: (Lesage, 2000)

b) Eigenschaften und Vorkommen

Neben der Strukturverwandtschaft zeichnen sich die K₂P-Kanäle durch ähnliche elektrische Eigenschaften wie geringe Spannungs- und Zeitabhängigkeit aus, und sie bleiben bei negativem Membranpotential geöffnet. Unter symmetrischen Kaliumbedingungen (d.h. gleiche intrazelluläre und extrazelluläre K⁺-Konzentration) weisen sie eine annähernd lineare Strom-Spannungskurve auf. Sie gleichen somit hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften einem K⁺-selektiven „Leck“ in der Membran, weshalb man sie im englischsprachigen Raum auch als „leak-channels“ bezeichnet. Aufgrund ihrer Eigenschaften vermitteln K₂P-Kanäle eine Hintergrundleitfähigkeit für K⁺ („background“ K⁺-Kanäle) und tragen so in Zellen verschiedener Gewebe zur Ausbildung und Stabilisierung des Ruhemembranpotentials bei. Die verschiedenen K₂P-Kanäle können durch eine Vielzahl physikalischer und chemischer Faktoren reguliert werden. Dazu gehören z.B. Protein-Kinase-C-abhängige Phosphorylierung (TWIK1, TWIK2), intrazelluläre (TWIK1, TWIK2) bzw. extrazelluläre pH-Änderungen (TASK-Kanäle), Arachidonsäure, Membrandehnung (TREK-1, TRAAK), Hypoxie und Inhalationsanästhetika (TREK-1, TASK-1). Sie werden darüber hinaus durch verschiedene Hormone und Neurotransmitter beeinflusst und sind an der Modulation der neuronalen Erregbarkeit beteiligt. Es wird daher davon ausgegangen, dass K₂P-Kanäle in eine Vielzahl pathophysiologischer Vorgänge involviert sind und somit neue potentielle therapeutische Ansatzpunkte darstellen (Lesage, 2000; Patel, 2001).

Die Untergruppe der TASK-Kanäle umfasst inzwischen 5 bekannte Mitglieder (TASK1-5). TASK2 (Girard, 2001) und TASK4 (Decher, 2001) werden neuerdings zur Gruppe der TALK (TWIK-related Alkaline-pH-activated K⁺ channel) genannten K₂P-Kanäle gezählt. TASK-Kanäle zeichnen sich durch eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Änderungen des extrazellulären pH-Wertes in einem kleinen physiologischen Bereich aus und erhielten aus diesem Grund auch ihren Namen (TWIK-related Acid Sensitive K⁺ channels). So fand man 90% des maximalen TASK1 Stroms bei pH 7.7, dagegen nur 10% bei pH 6.3. Die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik war dabei sehr schnell. Außerdem änderte sich die Anzahl der aktiven Kanäle, aber nicht die Einzelleitfähigkeit des Kanals. (Lesage, 2003). Die pH-Empfindlichkeit von TASK3 ist im Vergleich zu TASK1 zu kleineren pH-Werten verschoben (halbmaximale Inhibierung (K_i): TASK1 pH 6.8, TASK3 pH 6.0 (Czirjak, 2002b).

Gegenüber klassischen K⁺-Kanal-Inhibitoren wie Ba²⁺, Cs⁺, TEA, und 4-AP zeigten sich TASK1 und TASK3 relativ unempfindlich, wohingegen TASK1 spezifisch durch

submikromolare Konzentrationen des Cannabinoids Anandamide gehemmt werden konnte (Maingret, 2001). Als weiteres Unterscheidungsmerkmal von TASK1 und TASK3 konnte eine Arbeitsgruppe (Clarke, 2004) Zn^{2+} als spezifischen Inhibitor des TASK3 Stroms nachweisen. Die Autoren diskutieren in ihrer Arbeit, dass die Funktion von TASK3 in Neuronen des Kleinhirns (cerebellar granule neurons, CGN) durch die Freisetzung von Zn^{2+} aus inhibitorischen Synapsen moduliert werden könnte. Der Inhibitor Ruthenium Red (RR) ist nur unter definierten Bedingungen zur Unterscheidung von TASK1 und TASK3 einsetzbar (z.B. bei Überexpression in *Xenopus laevis* Oocyten), da *in vivo* weitere Ionenkanäle (TRAAK, Ca^{2+} -Kanäle) durch RR gehemmt werden (Czirjak, 2002a). In einer Arbeit (Lopes, 2005) wurde für TASK1 und TASK3 (sowie weitere K2P-Kanäle) eine Inhibierung durch G_{Protein} -gekoppelte Rezeptoren nachgewiesen. Diese Inhibierung soll demnach von einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und nachfolgender Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) abhängen, wodurch sich die lokale Zusammensetzung der Plasmamembran in der Umgebung der TASK-Kanäle ändert. Eine andere Arbeitsgruppe (Chen, 2006) fand dagegen eine direkte Inhibierung von TASK1 und TASK3 durch die $G_{\alpha q}$ -Untereinheit, die unabhängig von der PLC-vermittelten PIP_2 -Hydrolyse war.

Aufgrund ihrer breiten Expression in verschiedenen Geweben wie Gehirn, Lunge, Plazenta, Hoden, Ovar, Leber, Pankreas, Niere und Nebenniere (Reyes, 1998; Czirjak, 2000; Lesage, 2000; Medhurst, 2001; Czirjak, 2002a; Lotshaw, 2006) nimmt man an, dass TASK-Kanäle bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse eine Rolle spielen. Im proximalen Tubulus der Niere beeinflusst TASK2 den Transport von Bicarbonat (Warth, 2004). Einige Arbeiten deuten auf eine Funktion von TASK1 und TASK3 im Stratum Granulosum des Kleinhirns hin (Aller, 2005; Brickley, 2007). Weiterhin wurde für TASK1 und TASK3 eine mögliche Rolle bei der O_2 -Rezeption diskutiert (Hartness, 2001; Johnson, 2004). Andere Untersuchungen zeigen eine mögliche Funktion von TASK1 und TASK3 in der Nebenniere (Czirjak, 2000; Czirjak, 2002a; siehe auch Kapitel 1.8). Außerdem scheint TASK3 in die Pathogenese von humanen Karzinomen (insbesondere Brustkrebs) involviert zu sein (Pei, 2003; Mu, 2003). In der hier vorgestellten Arbeit stand die Untersuchung des Einflusses von TASK1 und TASK3 auf die Nebennierenfunktion im Vordergrund.

2 Zielsetzung

Das Mineralokortikoid Aldosteron wird in der Nebenniere gebildet und ist wesentlich an der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts beteiligt. Störungen der Aldosteronsekretion tragen zur Entstehung von Erkrankungen wie Bluthochdruck bei. Bisherige Daten aus der Literatur sprechen dafür, dass die Kaliumkanäle TASK1 und TASK3 in der Nebenniere an der Regulation der Aldosteronfreisetzung beteiligt sind. So werden TASK1 und TASK3 in Glomerulosazellen der Nebennierenrinde exprimiert. Sie werden durch Ang II gehemmt und bestimmen maßgeblich das Membranpotential dieser Zellen (Czirjak, 2000; Czirjak, 2002b).

Diese Daten wurden in Versuchen mit primär kultivierten Nebennierenzellen und mit überexprimierenden *Xenopus laevis* Oocyten erhoben. Allerdings sind Ergebnisse, die aus *ex vivo*- (Primärzellen) bzw. *in vitro*-Experimenten (Oocyten) gewonnen werden, nicht ohne weiteres auf die Situation *in vivo* im intakten Organ übertragbar. Es ist bekannt, dass primär kultivierte Zellen ihre Eigenschaften verändern können (Goldberg, 1983; Roskelley, 1990). Ein Überexpressionssystem kann meist nur einen Teil des Regulationsmechanismus abbilden, da unter Umständen wichtige Stellgrößen fehlen (humorale Faktoren, Zell-Zell-Kontakte, Expression weiterer Bestandteile der Signalkaskade).

Um die Bedeutung von TASK1 und TASK3 für die Funktion der Nebenniere *in vivo* aufzuklären, wurden Mäuse, denen das Gen für TASK1 bzw. für TASK3 fehlte, mit Wildtypmäusen verglichen. Es wurde untersucht, welchen Einfluss die Deletion von TASK1 bzw. TASK3 auf die Aldosteronkonzentration im Plasma dieser Mäuse hat und in welchem Maße die Regulation der Aldosteronfreisetzung gestört ist. Durch diese Versuche wurde in beiden Knockout-Mausstämmen ein Hyperaldosteronismus nachgewiesen. Je nach Typ der Deletion (TASK1 oder TASK3) war dieser Hyperaldosteronismus in Abhängigkeit von Alter und/oder Geschlecht unterschiedlich ausgeprägt. In weiteren Experimenten sollten die Auswirkungen und möglichen Ursachen des Hyperaldosteronismus bei *task1*^{-/-} und *task3*^{-/-} Mäusen näher untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten dadurch zu einem besseren Verständnis der Regulation der Aldosteronsekretion beitragen und damit Hinweise auf mögliche Ursachen von krankhaften Veränderungen des Mineralokortikoidhaushalts geben.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Augenschere (und weitere chirurgische Instrumente)	FST, Bad Oeynhausen, D
Autoklav	Tuttnauer 2540ELC, biomedis GmbH, Gießen, D
Brutschrank	Heraeus Instruments, Osteode, D
EPC-10 Patch-Clamp Verstärker	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, D
Fluoreszenz-Imagingsystem (Filterrad-basiert)	Molecular Devices Corporation, Downingtown, PA , USA
Gasmischanlage für Isofluran Verdampfer	MFI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, D
Hämatokrit-Zentrifuge	Biofuge haemo, Heraeus Instruments, Osteode, D
Invertmikroskop	Axiovert 200, Zeiss, Jena, D
Isofluran Verdampfer	Vapor 19.3, Dragerwerk AG, Lübeck, D
konfokales Mikroskop	LSM 510, Zeiss, Jena, D
Kryostat	Leica CM3050 S, Wetzlar, D
Light-Cycler System 2.0	Roche, Mannheim, D
Metamorph V6.2r2 (Software für Fluoreszenzmikroskop)	Molecular Devices Corporation, Downingtown, PA , USA
Mikrotiterplatten-Photometer	TECAN Sunrise, Tecan Trading AG, CH
Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
PowerLab zur Aufnahme der Ussing-Kammer-Daten	AD Instruments, A
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Rollerpumpe	Ismatec SA., Zürich, CH
Setup zur Blutdruckmessung	TSE, Karlsruhe, D
Stereo-Mikroskop (OP-Platz)	Stemi SV6, Zeiss, Jena, D
Thermocycler T1	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, D
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
UV-Photospektrometer	Genova, Jenway, Essex, E
Wärmeplatte für Operationen	Dr. J. Barhanin, Nizza, F
Wasserbad	Modell W13, Haake, Karlsruhe, D

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
0,5 ml Insulin-Spritzen	BD Micro-Fine, BD Consumer Healthcare, Heidelberg, D
Blotting-Papier (Chromatographie Papier 3mm) Whatmann	Whatmann GmbH, Dassel, D
Glaskapillaren für Patchpipetten	Clark electromedical Instruments, Reading, E
Glycergel mounting medium	Dako, Hamburg, D
heparinisierte Mikro-Hämatokrit-Kapillaren	Brand GmbH CO KG, Wertheim, D
Latex-Handschuhe	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Lightcycler Kapillaren	Roche, Mannheim, D
Medical X-ray film	Fotochemische Werke GmbH, Berlin, D
Mikrotiterplatten	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D

Nitrocellulose-Membran	Amersham Bioscience, Freiburg, D
OCT-Medium	Tissue-Tek, Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL
PE-Schläuch (Katheter)	Benno Kummer, Freiburg, D
Petrischalen	Nuclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Polysin Objektträger	Kindler, Freiburg, D

3.1.3 Chemikalien, Arzneistoffe, Hormone

Produkt	Hersteller
17 β -Estradiolbenzoat	Sigma, Taufkirchen, D
2-Methylbutan	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe, D
Agarose	AppliChem, Darmstadt, D
Angiotensin II (Ang II)	Sigma, Taufkirchen, D
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
BSA (Albumin from bovine serum)	Sigma, Taufkirchen, D
CaCl ₂	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D
Canrenoat	Sigma, Taufkirchen, D
Dexamethason	Sigma, Taufkirchen, D
D-Glucuronsäure Calciumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
D-Kaliumgluconat	Sigma, Taufkirchen, D
D-Mannitol	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
EDTA	Sigma, Taufkirchen, D
EGTA	Sigma, Taufkirchen, D
Ethanol	J. T. Baker, Deventer, NL
FCS (Fötales Kälberserum)	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Glucose	Merck, Darmstadt, D
Glycin	Merck, Darmstadt, D
Heparin-Lösung	Liquemin N 25000, 5 ml, Roche, Mannheim, D
HEPES	AppliChem, Darmstadt, D
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
isotone Natriumchloridlösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, D
KCl	Merck, Darmstadt, D
Ketamin	Sigma, Taufkirchen, D
KH ₂ PO ₄ *3H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Kreatinin	Sigma, Taufkirchen, D
L-Glutamin, 200 mM (100x), Flüssig	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Mäusefutter	SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, D
MEM alpha medium	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
MgCl ₂ *6H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
MgSO ₄ *7H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
NaN ₃	Sigma, Taufkirchen, D
Na-Pyruvat, 100 mM Lösung	Sigma, Taufkirchen, D

Natriumacetat	Merck, Darmstadt, D
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Penicillin-Streptomycin-Lösung, Flüssig	1000 I.E./ml Pen G, 10000 µg/ml Strep.-Sulfat, Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Saccharose	Merck, Darmstadt, D
SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz)	Merck, Darmstadt, D
Sesamöl, raffiniert	Henry Lamotte GmbH, Bremen, D
TEMED	Roth, Karlsruhe, D
Testosteron (Androtardyl)	Bayer Schering Pharma AG, Berlin, D
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen, D
Trypsin-EDTA-Lösung (10x), Flüssig	0,5% Trypsin / 5,3 mM EDTA, Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Xylazin Hydrochlorid 2%	cp-pharma, Burgdorf, D
α-Ketoglutarat	Sigma, Taufkirchen, D

3.1.4 Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
¹²⁵ I RIA zur Aldosteron-Messung	DEMEDITEC Diagnostics GmbH, Kiel, D
¹²⁵ I RIA zur Corticosteron-Messung	MP Biomedicals, LLC, USA
¹²⁵ I RIA zur Renin-Messung	Byk & DiaSorin Diagnostics, D
Bradford-basierter Protein-Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Collagenase Typ IV (aus Clostridium histolyticum)	Sigma, Taufkirchen, D
DNase I (RNase-Free DNase Set)	Quiagen, Hilden, D
dNTP-Mix	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Lämmli-Probenpuffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, Wisconsin, USA
M-MLV Reverse Transkriptase Puffer (5x)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Random Hexamer Primer (100 µM)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
RNase Inhibitor	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, D
RNeasy Mikro kit	Quiagen, Hilden, D
SYBR® Green PCR Kit	Quiagen, Hilden, D
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, D

3.1.5 Oligonukleotide

Alle Oligonucleotide wurden von Invitrogen, Karlsruhe, D hergestellt.

Gen		Primersequenz 5'→3'	Annealing-Temp.	Amplikongröße
<i>Primer für Realtime PCR</i>				
TASK3	se	CAC TGT CAT CAC AAC TAT CGG	55°C	80 bp
	as	CAG CGT AGA ACA TAC AGA AGG		
CYP11B2	se	GCA CCA GGT GGA GAG TAT GC	55°C	113 bp
	as	GCC ATT CTG GCC CAT TTA G		
beta-actin	se	GACAGGATGCAGAAGGAGATTACTG	57°C	98 bp
	as	CCACCGATCCACACAGAGTACTT		

Genotypisierungs- primer				
TASK1 (WT Allel)	se	TCATCGTGTGCACCTTCACC	2-Schritt- PCR: (4 Zyklen 60°C, 36 Zyklen 57°C)	234 bp
	as	TGATGGCGAAGTAGAAGGAGC		
TASK1 (Knockout Allel)	se (neo)	CCTTCTATCGCCTTCTTGACG		344 bp
	as	TGATGGCGAAGTAGAAGGAGC		
TASK3	se	ATG CTC TAA TCT CCA GTC TG		
	as	TGC GAG CTT CAG AGA GGA TG		

3.1.6 Antikörper/Fluoreszenzfarbstoffe

Bezeichnung	Art	eingesetzte Verdünnung	Hersteller
anti-CYP11B2, rabbit polyclonal IgG	Primär-Antikörper	1:50	(Wotus, 1998)
anti-beta-actin, polyclonal IgG	rabbit Primär-Antikörper	1:1000	Sigma, Taufkirchen, D
anti-renin, chicken polyclonal IgY	Primär-Antikörper	1:300	(Kurtz et al., 2007)
Alexa Fluor® 488 donkey anti- rabbit	Sekundär-Antikörper (IF)	1:800	Invitrogen, Karlsruhe, D
TRITC donkey anti-chicken	Sekundär-Antikörper (IF)	1:500	Dianova, Hamburg, D
HRP-goat-anti-rabbit polyclonal IgG	Sekundär-Antikörper (WB)	1:7500	Santa Cruz, Heidelberg, D
HOE33342 (Stockkonz.: 5x10E-4)	Zellkernmarker	1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D

3.1.7 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Endkonzentration
Fixierlösung I, pH 7.4	EGTA	1 mM
	K ₂ HPO ₄	15 mM
	MgCl ₂	2 mM
	NaCl	90 mM
	Paraformaldehyd	3%
	Saccharose	3.4%
	Aqua dest.	

Fixierlösung II, pH 7.4	EGTA	1 mM
	K ₂ HPO ₄	15 mM
	MgCl ₂	2 mM
	NaCl	90 mM
	Paraformaldehyd	1%
	Saccharose	17%
	in Aqua dest.	

PBS-Puffer, pH 7.4	KH ₂ PO ₄	1.8 mM
	Na ₂ HPO ₄	10.3 mM
	NaCl	137 mM
	in Aqua dest.	

RIPA-Aufschluss-Puffer, pH 7.4	SDS	0.1%
	Igepal	1%
	Natriumdesoxycholat	0.5%
	Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, 100x stock)	1x
	PMSF	1 mM
	in PBS	

SDS-PAGE Trenngel (8%)	30% Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisch	8%
	1.5 M Tris (pH 8.8)	375 mM
	10% SDS	0.1%
	10% APS (Ammoniumpersulfat)	0.1%
	TEMED	0.06%
	in Aqua dest.	

SDS-PAGE-Sammelgel	30% Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisch	5%
	0.5 M Tris (pH 6.8)	62.5 mM
	10% SDS	0.1%
	10% APS (Ammoniumpersulfat)	0.1%
	TEMED	0.1%
	in Aqua dest.	

SDS-PAGE Laufpuffer 5x, pH 8.3	TRIS	124 mM
	Glycin	0.959 M
	SDS	17.3 mM
	in Aqua dest.	

Transfer-Puffer für WB	Methanol	200 mL
	5x SDS-PAGE Laufpuffer	200 mL
	auf 1L mit Aqua dest.	

Block-Lösung, pH 7.4 (für WB)	Trockenmilchpulver	5%
	Tween-20	0.1%
	in PBS	

Wasch-Lösung, pH 7.4 (für WB)	Tween-20	0.1%
	in PBS	

Antikörper-Verdünnungslösung, pH 7.4 (für Sekundär-AK im WB)	Trockenmilchpulver	1%
	Tween-20	0.1%
	in PBS	

Antikörper-Verdünnungslösung, pH 7.4 (Primär-AK im WB)	BSA	1.5%
	Tween-20	0.1%
	NaN ₃	0.01%
in PBS		

Block-Lösung, pH 7.4 (für IF)	BSA	5%
	Triton X-100	0.04%
	in PBS-Puffer	

Antikörper-Verdünnungslösung, pH 7.4 (für IF)	BSA	0.5%
	Triton X-100	0.04%
	in PBS-Puffer	

Verdau-Lösung, pH 7.4 (zur Isolation von Nebennierenzellen)	Calcium-Gluconat	1.3 mM
	Collagenase Typ IV	1 mg/ml
	Glycin	2 mM
	K ₂ HPO ₄	1.6 mM
	KH ₂ PO ₄	0.4 mM
	MgSO ₄	1 mM
	Na-acetat	10 mM
	NaCl	140 mM
	α-Ketoglutarat	1 mM
	in Aqua dest.	

Kulturmedium für Primärzellkultur aus Nebennieren	fetales Kälberserum	2%
	Pferdeserum	8%
	Ascorbinsäure	0.1 mM
	Vitamin E	1 μM
	Insulin	1 μg/mL
	Penicillin G	50 U/mL
	Streptomycin	50 μg/mL
	in einer 1:1 Mischung aus:	
	Ham's F-12 und Dulbecco's modified Eagle's Medium	

Pipettenlösung, pH 7.4 (Patch-Clamp Messungen)	ATP	3 mM
	CaCl ₂	0.726 mM
	EGTA	1 mM
	Glucose	5 mM
	Kaliumgluconat	95 mM
	KCl	30 mM
	MgCl ₂	2.38 mM
	Na ₂ HPO ₄	4.8 mM
	NaH ₂ PO ₄	1.2 mM
	in Aqua dest.	

Ringer-Kontroll-Lösung, pH 7.4	NaCl	145 mM
(Patch-Clamp Messungen)	KH ₂ PO ₄	0.4 mM
	K ₂ HPO ₄	1.6 mM
	MgCl ₂	5 mM
	Glucose	1 mM
	CaCl ₂	1.3 mM
	HEPES	5 mM
	in Aqua dest.	

3.2 Methoden

3.2.1 Untersuchte Mäuse

Die *task1*^{-/-} Mäuse stammten aus dem Labor von W. Wisden (IZN, Universität Heidelberg) (Aller, 2005). Die *task3*^{-/-} Maus wurde im Labor von Dr. F. Lesage (CNRS, Sophia-Antipolis, Frankreich; bisher nicht veröffentlicht) generiert. Die für diese Arbeit eingesetzten Knockout-Tiere wurden mindestens 7 Generationen in den genetischen Hintergrund des Mausstamms C57Bl/6J zurückgekreuzt. Als Kontrolltiere wurden genetisch nicht modifizierte C57Bl/6J verwendet. Alle Mäuse hatten einen 12 Stunden Hell-Dunkel Rhythmus, freien Zugang zu Futter und Wasser und wurden unter gleichen Bedingungen in offener Tierhaltung gehalten. Die experimentellen Protokolle wurden von den örtlichen Tierschutzbehörden genehmigt und nach dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

3.2.2 Salzdiäten

Um den Einfluss physiologischer Regulatoren der Aldosteronsekretion zu testen wurden die Tiere mit verschiedenen Salzdiäten für den jeweils angegebenen Zeitraum gefüttert (meist 2-4 Tage). Der Kaliumgehalt des Standardfutters der Mäuse (Pellets, ssniff, Soest, Deutschland) betrug 0.75%, der Natriumgehalt 0.27%. Folgende Diäten wurden über Spezialfutter mit definiertem Salzgehalt (ssniff) angeboten: hoch-K⁺ (3% K⁺), niedrig-K⁺ (0.05% K⁺), oder niedrig-Na⁺ (<0.005% Na⁺).

3.2.3 Analyse von Elektrolyt-, Aldosteron- und Corticosteronkonzentration im Plasma

Blut von Mäusen wurde durch Punktion des retrobulbären Venenplexus unter Narkose oder nach kleiner Schwanzinzision, sowie bei Mäusen, die jünger als 21 Tage alt waren, im Lethalversuch unter Narkose durch Herzpunktion in heparinisierten Kapillaren gesammelt. Die Proben wurden zentrifugiert (5 min 8000 rpm, Hämatokritzentrifuge) und das erhaltene Plasma bis zur Analyse bei -80°C eingefroren. Die Aldosteronkonzentration im

Plasma wurde mit Hilfe eines Radioimmunoassays (^{125}I RIA Kit, Demeditec, Kiel, D), der eine geringere Kreuzreaktivität für Corticosteron aufwies, bestimmt. Die Corticosteronkonzentration im Plasma wurde von Dr. J. Barhanin (CNRS, Sophia-Antipolis, Frankreich) gemessen (^{125}I RIA, MP Biomedicals, LLC, USA). Die Konzentration von Na^+ und K^+ im Plasma wurde mit Hilfe eines Flammenphotometers (PFP7, Jenway, England) bestimmt.

3.2.4 Blutdruckmessung

Blutdruckmessungen an den Mäusen wurden mittels Manometrie über eine Schwanzmanschette (TSE, Germany) von Stefan Jungbauer im Rahmen seiner medizinischen Doktorarbeit durchgeführt und werden zum besseren Verständnis der Daten hier mit aufgeführt. Die Mäuse wurden an 4 aufeinander folgenden Tagen an die Messprozedur gewöhnt. Vor dem Start der Messung saßen die Mäuse schon mindestens 5 min in der auf 37°C vorgewärmten Kammer. An jedem Messtag wurde der Blutdruck als Mittelwert von 10 Zyklen bestimmt, wobei jeder Zyklus aus 4 Einzelmessungen bestand. Zur Hemmung des Mineralokortikoidrezeptors wurde Canrenoat (1.25 g/L, mit 10% Saccharose zur Überdeckung des bitteren Geschmacks) 10 Tage lang dem Trinkwasser zugesetzt. Die Blutdruckmessung wurde an den letzten 5 Tagen dieser Periode durchgeführt. Vor der Behandlung mit Canrenoat wurden die Mäuse 5 Tage lang in einer Kontrollperiode an das mit 10% Saccharose versetzte Trinkwasser gewöhnt.

3.2.5 Reninaktivität im Plasma

Die Reninmessungen wurden im Labor von Frank Schweda (Physiologie, Universität Regensburg) durchgeführt. Plasmaproben wurden wie oben beschrieben gewonnen. In einem enzymatischen Schritt wurde durch Inkubation der Plasmaproben mit Plasma von bilateral nephrektomierten Ratten als Reninsubstrat in Abhängigkeit von der im Mäuseplasma vorhandenen Renin-konzentration Angiotensin I generiert. Die Konzentration des entstandenen Angiotensin I wurde mit Hilfe eines Radioimmunoassays (^{125}I RIA, Byk&DiaSorin Diagnostics, Deutschland) bestimmt und diente als Maß für die Reninaktivität (ng/mL/h Angiotensin I).

3.2.6 Ussing-Kammer Experimente

Nach Tötung der Mäuse durch zervikale Dislokation wurde das distale Kolon entnommen und der Darminhalt durch Spülen mit kalter Kontrolllösung entfernt. Anschließend wurde das Kolon auf einen Glasstab gezogen und nach zirkulärer Inzision die Mukosa von der Muskelschicht getrennt. Ein Teil der Mukosa wurde in einem Insert mit 1 mm Öffnungs-

durchmesser fixiert und in die Ussing-Kammer überführt. Dabei handelte es sich um eine aus zwei Hälften bestehende Kammer, in deren Mitte sich das Insert mit dem Gewebepräparat befand. Die beiden Hälften der Ussing-Kammer waren jeweils mit einem separaten Zu- und Ablauf versehen und wurden auf 37°C beheizt. Das transepitheliale Potential (V_{te}) wurden im sogenannten „Open circuit“-Modus gemessen. Der transepitheliale Widerstand (R_{te}) wurde aus der Spannungsdeflektion (ΔV_{te}) berechnet, die durch einen kurzen Strompuls (0.5 μ A, 2 s) induziert wurde. Der äquivalente Kurzschlussstrom (I_{sc}) berechnete sich dann nach V_{te}/R_{te} . Bei der Berechnung erfolgte eine Korrektur durch V_{te} und R_{te} des leeren Inserts. Die verwendeten Lösungen wurden im Zulauf der Ussing Kammer durch Wasserschlauchheizung auf 37°C vorgewärmt. Die Kontrolllösung enthielt (in mmol/L): 5 HEPES, 140 NaCl, 5 Natriumazetat, 0.4 KH_2PO_4 , 1.6 K_2HPO_4 , 5 D-Glucose, 1 $MgCl_2$, 1.3 $CaCl_2$, pH 7.4. Indomethacin (10 μ mol/L) wurde zugesetzt, um die Generierung endogener Prostaglandine und mögliche sekretorische Aktivität des Kolon-Mukosa zu verhindern. Während der Kontrollphase wurden die luminale und die basolaterale Seite des Gewebes mit der Kontrolllösung umspült. Die Applikation von luminal 10 μ M Amilorid führte zur Hemmung des epithelialen Na^+ -Kanals (ENaC), die sich in einer Abnahme von R_{te} und einer Verschiebung von V_{te} (bis zu positiven Werten) zeigte. Der Amilorid-empfindliche Kurzschlussstrom wurde nach $\Delta I_{sc} = I_{sc(\text{kontrolle})} - I_{sc(\text{Amilorid})}$ berechnet. Die Daten wurden mit einem PowerLab Setup (AD Instruments, Österreich) aufgezeichnet und analysiert.

3.2.7 Perfusionsfixierung mit Paraformaldehyd

Die Mäuse wurden über eine Inhalationsmaske mit einem Gemisch aus Stickstoff/Sauerstoff (1:1), dem Isofluran beigemischt wurde, anästhesiert. Nach Öffnung der Bauchdecke wurde ein Polyethylenkatheder in die abdominale Aorta eingeführt und die Vena cava inferior auf gleicher Höhe eingeschnitten, um einen Abfluss des Perfusats zu ermöglichen. Die Perfusion erfolgte zunächst mit heparinisierte isotoner NaCl Lösung (10 mL 0.9% NaCl mit 10 IU/ mL Heparin) und anschließend mit 3% Paraformaldehyd (PFA) in PBS (50 mL, 15 mL/ min), welches eine Fixierung des Gewebes durch Quervernetzung der Proteine ermöglicht. Die Nebennieren und Nieren wurden entnommen und in 17% Saccharose/PBS äquilibriert, um Schäden beim Einfrieren und späteres Austrocknen bei Anfertigung der Gefrierschnitte zu vermeiden. Dann wurde das Gewebe zuerst in 2-methyl-Butan und dann in flüssigem Stickstoff schrittweise heruntergekühlt. Das sequentielle Einfrieren sollte dabei die Entstehung von Rissen im Gewebe verhindern. Bis zur Analyse wurde das Gewebe bei -80°C gelagert.

3.2.8 Immunfluoreszenzfärbungen

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden 5 µM dicke Gefrierschnitte auf mit Polylysin beschichteten (Kindler, Freiburg, Deutschland) Objektträgern angefertigt. Zur Demaskierung der Epitope wurden die Schnitte 5 min mit 0.1% SDS in PBS behandelt. Nach Waschen mit PBS und Blockieren unspezifischer Bindungen mit 5% Bovinem Serum Albumin (BSA) für 10 min wurden die Schnitte mit den verschiedenen Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung entweder über Nacht bei 4°C oder 1h bei RT inkubiert. Die Blockierlösung, sowie die Lösungen zum Verdünnen der Antikörper enthielten zum Permeabilisieren der Zellmembran 0.01% Triton-X-100, wodurch die Zugänglichkeit der Epitope verbessert wurde. Nach erneutem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation der spezifischen an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:400, Dianova, Hamburg, Deutschland) für 1h bei RT. Nach Waschen in PBS und kurzem Eintauchen in destilliertem Wasser (um die Bildung von Salzkristallen zu verhindern) wurden die Objektträger mit einem Deckgläschen mit Mounting-Medium versiegelt (Glycergel-Mounting-Medium, Dako, Hamburg, D). Die Analyse der Färbungen erfolgte mit einem Filtrerrad-basierenden Imaging System (Universal Imaging Corporation, Dowingtown, PA, USA), welches an ein inverses Mikroskop (Axiovert 200M; Zeiss, Jena, Deutschland) gekoppelt war. Weitere Aufnahmen wurden an einem konfokalen Mikroskop (LSM 510 Meta; Zeiss, Jena, Deutschland) angefertigt.

3.2.9 Kastration und Hormonbehandlung

5 Wochen alte männliche Mäuse wurden unter Narkose über Einschnitt des Hodensacks und Entfernung der Hoden kastriert. Zur Östrogenbehandlung erhielt ein Teil der kastrierten Mäuse tägliche Injektionen von 17β-Estradiolbenzoat (4 µg/g/Tag, s.c.). Im Alter von 10 Wochen wurden die Mäuse mit PFA perfundiert und die fixierten Organe für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet. Um die Effekte von Androgenen in weiblichen Mäusen zu untersuchen, wurde *task1*^{-/-} Weibchen ab der 4. Lebenswoche 3 Wochen lang 2 mal pro Woche 1 mg Testosteron (Androtardyl, Schering; gelöst in 50 µL Sesamöl) s.c. injiziert (Wunderlich et al., 2005).

3.2.10 RNA Isolierung

RNA aus Nebennieren wurde mit dem RNeasy-Mikro-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend den Vorgaben des Herstellers isoliert. Die Qualität und Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurde über ein Agarosegel (1.5% Agarose, Verhältnis der 28S zur

18S rRNA-Bande sollte ca. 2:1 betragen) und mit einem UV-Photospektrometer (OD bei 260 nm, OD von 1 entspricht 40 ng/ μ L RNA, Verhältnis 260/280 nm 1.8-2.0) bestimmt.

3.2.11 Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Aus der isolierten Gesamt-RNA wurde durch reverse Transkription (M-MLV Reverse Transkriptase; Promega, Mannheim, Deutschland) komplementäre DNA (cDNA) nach den Angaben des Herstellers synthetisiert. Es wurden random-Primer eingesetzt, die aufgrund ihrer zufälligen Sequenz ein Umschreiben der Gesamt-RNA ermöglichen. Die erhaltene cDNA diente als template für die quantitativen Realtime PCR.

3.2.12 Quantifizierung der Genexpression mittels Realtime PCR

Mit Hilfe spezifischer Primer und Realtime PCR wurde die Genexpression in den Nebennieren bestimmt. Dabei wurde ein auf SybrGreen (Qiagen, Hilden, Germany) als Fluoreszenzfarbstoff basierendes Messverfahren auf einem Kapillarcycler (Light-Cycler System 2.0, Roche, Mannheim, D) eingesetzt. Der Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen hat eine Anregungswellenlänge von 470 nm und emittiert bei 585 nm gebunden an doppelsträngige DNA wesentlich mehr Fluoreszenzlicht als in freier Lösung. Misst man nun in der Elongationsphase der PCR diese Emission, kann man aus dem Verlauf der Emission über die Zyklenzahl auf die vorliegende Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA schließen. In der exponentiellen Phase verdoppelt sich die DNA-Menge an spezifischem Produkt idealerweise mit jedem Zyklus. Später flacht die Kurve ab und geht in die Sättigung über (Verbrauch der Nukleotide, Produktinhibition). Die Zyklenzahl, die benötigt wird, bis ein Fluoreszenzsignal messbar ist, das über dem Hintergrund liegt, wird mit C_t (oder C_p) bezeichnet und hängt von der ursprünglich enthaltenen spezifischen cDNA ab. Da bei der cDNA-Synthese die eingesetzte RNA-Menge nicht absolut mit der erhaltenen cDNA-Konzentration korreliert, wird die unter den verschiedenen Bedingungen stabile Expression eines Referenzgens (Haushaltsgen) zur Normalisierung herangezogen. Die Auswertung erfolgte anhand der delta-delta C_t Methode, als Referenzgen diente beta-actin. Die PCR kann für die verschiedenen Primer und templates unterschiedlich effizient verlaufen. Die Effizienz der Reaktion wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe bestimmt und bei der Berechnung berücksichtigt. Folgende Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen C_t -Wert, Effizienz und eingesetzter Ausgangsmenge an spezifischer cDNA:

$$\text{Expressionshöhe}_{\text{Zielgen}} = (\text{Effizienz}_{\text{Referenzgen}})^{\wedge C_t \text{ Referenzgen}} / (\text{Effizienz}_{\text{Zielgen}})^{\wedge C_t \text{ Zielgen}}$$

3.2.13 Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot

Zur Gewinnung von Proteinlysaten wurde von narkotisierten Mäusen Gewebe entnommen, unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Das Gewebe wurde mittels Mörser und Stößel in flüssigem Stickstoff pulverisiert und anschließend in RIPA-Puffer (0.1% SDS, 1% Igepal, 0.5% Na-desoxycholat, Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Deutschland); in PBS, pH 7.4) unter Benutzung einer feinen Kanüle (27-Gauge) homogenisiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden nicht homogenisierte Zelltrümmer durch Zentrifugation für 10 min bei 10000 g und 4°C entfernt. Vom Überstand wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe eines auf Bradford basierenden Assays (Biorad, München, D) bestimmt. Gleiche Mengen an Protein wurden mit reduzierendem Laemmli Probenpuffer (Biorad) 1:1 gemischt und mittels Gelelektrophorese (8% SDS-PAGE) aufgetrennt. Danach erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran mit Hilfe eines Semi-dry-Blotters (Biorad) bei konstant 100 mA für 90 min. Die Membran wurde in PBS gewaschen und unspezifische Proteinbindung durch Inkubation mit 5% Trockenmilch in PBS (0.1% Tween-20) 1h bei RT unter Schütteln abgesättigt. Nach dem Blocken wurde die Membran über Nacht mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung bei 4°C inkubiert. Die Verdünnungslösung für den Primärantikörper enthielt 1.5% BSA, 0.1% Tween, 0.02% Natriumazid in PBS. Nach 3fachem Waschen in 0.1% Tween/PBS erfolgte Inkubation mit HRP-gekoppeltem spezifischem Sekundärantikörper (1:7500) in 1% Trockenmilch/0.1% Tween/PBS für 1h bei RT. Danach wurde erneut in PBS gewaschen. Der Bindung des Sekundärantikörpers wurden auf der Membran mit Western Blotting Luminol Reagenz (Santa Cruz, Heidelberg, D) durch Nachweis der HRP-Reaktion auf lichtempfindlichem Film (Fotochemische Werke GmbH, Berlin) sichtbar gemacht.

3.2.14 Primärkultur und Patch-clamp Experimente von Nebennierenzellen

Männliche Wildtypmäuse und *task1*^{-/-} Mäuse wurden unter Narkose mit einer Collagenase enthaltenden Ringerlösung (12 mL/ Maus, Collagenase Typ II, 1mg/mL; Biochrom, Berlin, Deutschland) perfundiert (Anlage entsprechend Perfusionfixierung). Die Nebennieren wurden entnommen, in kleine Stücke geschnitten und 15 min bei 37°C verdaut. Die so gewonnenen Einzelzellen und Zellhaufen wurden in Kulturschalen (BD Falcon, Heidelberg, D) in Nebennieren-Zellkulturmedium (siehe Materialteil) ausgesät und 4-24h danach für Patch-clamp Versuche verwendet. Whole-Cell-Messungen wurden mit einem EPC-10 Verstärker (HEKA, Deutschland) durchgeführt. Die Patchpipettenlösung enthielt

(in mM) 95 Kaliumgluconat, 30 KCl, 4.8 Na₂HPO₄, 1.2 NaH₂PO₄, 5 Glucose, 2.38 MgCl₂, 0.726 CaCl₂, 1 EGTA, 3 ATP, pH 7.2. Die extrazelluläre Lösung vom Typ Ringer enthielt (in mM) 145 NaCl, 0.4 KH₂PO₄, 1.6 K₂HPO₄, 5 Glucose, 1 MgCl₂, 1.3 CaCl₂, 5 HEPES, pH 7.4. Unterschiede im Ganzzellstrom, induziert durch einen Spannungssprung von -95 auf +30 mV, wurden auf die Zellkapazität (pA/pF), die ein Maß für die Größe der Zelloberfläche ist, normalisiert. Alle Experimente fanden bei 37°C statt.

3.2.15 Statistik

Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden als Mittelwerte der jeweils untersuchten Proben berechnet und werden inklusive der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Signifikanzberechnungen zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des Student's t-test durchgeführt (im Vergleich der Gruppen ungepaart, bei Vergleich innerhalb einer Gruppe gepaart). Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet und in den jeweiligen Graphen mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Untersuchung der *task1*^{-/-} Mäuse und danach die erhobenen Daten der *task3*^{-/-} Mäuse gezeigt. Zur besseren Lesbarkeit werden Wildtypmäuse (*task1*^{+/+} und *task3*^{+/+}) mit „WT“ abgekürzt und die homozygoten knockout-Mäuse jeweils mit „*task1*^{-/-}“ und „*task3*^{-/-}“ bezeichnet.

4.1 Untersuchung des adrenalen Phänotyps der *task1*^{-/-} Mäuse

4.1.1 Konzentration von Aldosteron unter verschiedenen Salzdiäten

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss die Deletion von TASK1 auf die Aldosteronkonzentration im Plasma der Mäuse hat. Durch Variation der Salzaufnahme über das Futter wurde überprüft, in welchem Maße die normale Regulation der Aldosteronfreisetzung von der TASK1-Expression abhängt.

Unter einer Normalsalz-Diät hatten *task1*^{-/-} Mäuse eine höhere Aldosteronkonzentration im Plasma als Wildtypmäuse und heterozygote Mäuse (*task1*^{+/+} 394 ± 73 ng/l, n=52; *task1*^{+/-} 235 ± 44 ng/l, n=22; *task1*^{-/-} 2361 ± 452 ng/l, n=55; beide Geschlechter gemittelt). Dieser Hyperaldosteronismus war beschränkt auf das weibliche Geschlecht, während männliche Mäuse normale Aldosteronwerte aufwiesen (Abb. 6). Um den Einfluss physiologischer Regulatoren der Aldosteronsekretion zu überprüfen, wurde die Salzaufnahme der Mäuse über den Salzgehalt der Nahrung variiert. Die Reaktion auf eine hohe bzw. niedrige K⁺, sowie eine niedrige Na⁺ Aufnahme fiel in den Wildtypmäuse und heterozygoten Mäusen, unabhängig vom Geschlecht, gleich aus. Die hoch-K⁺ und niedrig-Na⁺ Diäten führten jeweils zu einem Anstieg der Aldosteronkonzentration im Plasma, während sie bei einer niedrig-K⁺ Diät abnahm. Im Gegensatz dazu zeichneten sich die weiblichen *task1*^{-/-} Mäuse durch einen totalen Verlust der physiologischen Kontrolle der Aldosteronsekretion aus: Die Konzentration von Aldosteron im Plasma wurde weder durch eine K⁺-reiche bzw. Na⁺-arme Diät stimuliert, noch durch eine K⁺-arme Diät verringert (Abb. 6A).

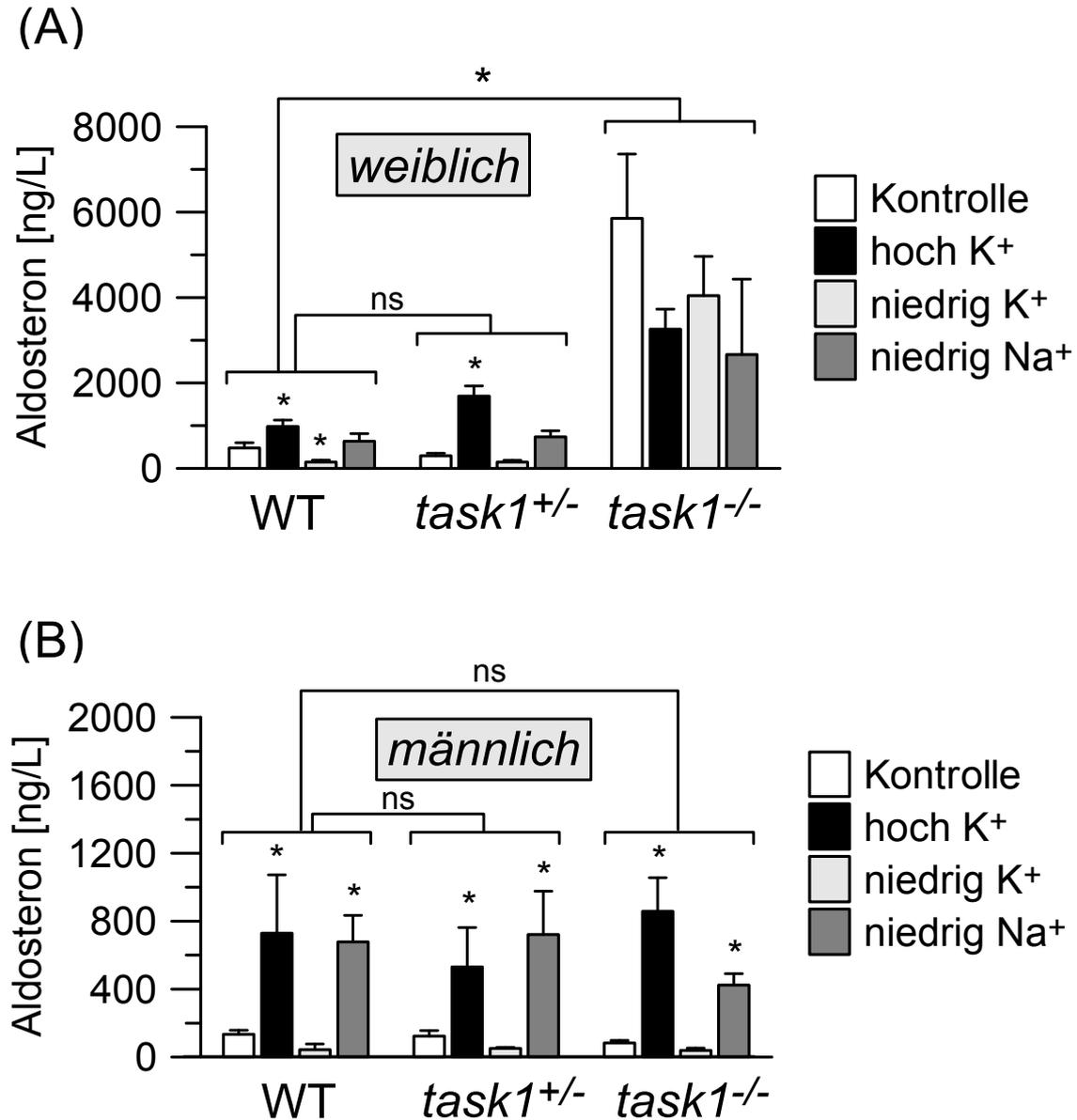


Abb. 6: Plasma-Aldosteron unter verschiedenen Salzdiäten (Einfluss von TASK1)

Dargestellt ist der Einfluss der TASK1-Deletion auf die Aldosteronkonzentration im Plasma adulter weiblicher (A) und männlicher Mäuse (B) in Abhängigkeit von der aufgenommenen Na⁺- und K⁺-Menge (man beachte bitte die unterschiedlichen Achsen in A und B). Heterozygote weibliche *task1*^{+/-} Mäuse und Wildtypmäuse (WT) unterschieden sich unabhängig von der Diät nicht signifikant voneinander bezüglich ihrer Aldosteronkonzentration ($P = 0.679$). Dagegen wiesen homozygote weibliche *task1*^{-/-} Mäuse jeweils signifikant höhere Aldosteronwerte auf ($P < 0.0001$). Bei Männchen änderte sich die Aldosteronkonzentration mit der jeweiligen Diät unabhängig vom Genotyp ($P > 0.1$). Die Anzahl der weiblichen Mäuse pro Genotyp lag je nach Diät zwischen 11-27 (WT), 13-15 (*task1*^{+/-}) bzw. 17-32 (*task1*^{-/-}) Tieren. Die entsprechende Anzahl der Männchen war 10-27 (WT), 3-9 (*task1*^{+/-}) bzw. 9-23 (*task1*^{-/-}). Diäten: Kontrolle (K⁺ 0.75%); hoch K⁺ (3%) niedrig K⁺ (0.05%); niedrig Na⁺ (Na⁺ <0.005%) Diät. *bedeutet statistisch signifikant verschieden von der Kontroll-Diät oder zwischen den Genotypen. ns: nicht signifikant verschieden.

4.1.2 Primärer Hyperaldosteronismus in weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen

Um zu entscheiden, ob ein primärer oder sekundärer Hyperaldosteronismus bei den weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen vorliegt, wurde die Renin-Aktivität im Plasma bestimmt. Zusätzlich wurde die Reninexpression in der Niere mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Dabei zeigte sich, dass die invariant hohe Aldosteronkonzentration im Plasma der weiblichen *task1*^{-/-} Mäuse von einer reduzierten Reninaktivität begleitet wurde (Abb. 7A). Außerdem wiesen die weiblichen *task1*^{-/-} Mäuse eine deutlich schwächere Reninfärbung im juxtaglomerulären Apparat als die Wildtypmäuse auf (Abb. 7B). Die erhöhten Aldosteronwerte scheinen also zu einer Hemmung der Reninsekretion zu führen. Demnach liegt bei den weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen ein primärer Hyperaldosteronismus vor, d.h. die hohe Aldosteronkonzentration kommt nicht durch die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems zustande. Bei einem sekundären Hyperaldosteronismus würde man dagegen eine erhöhte Reninaktivität erwarten.

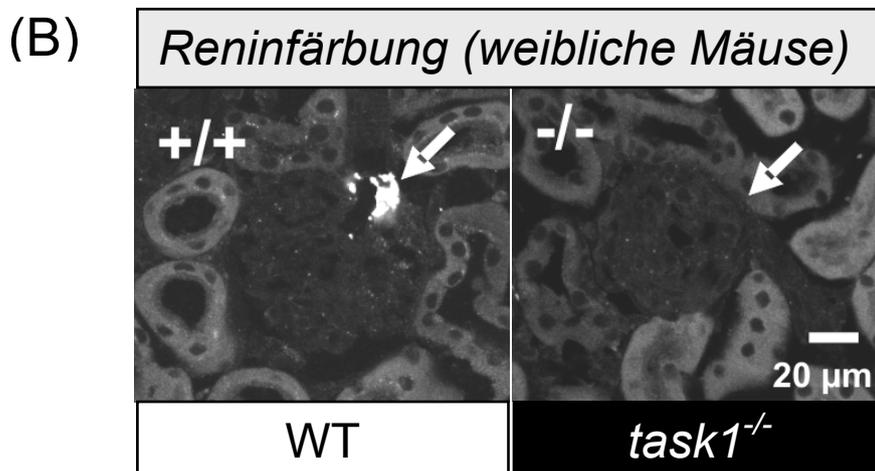
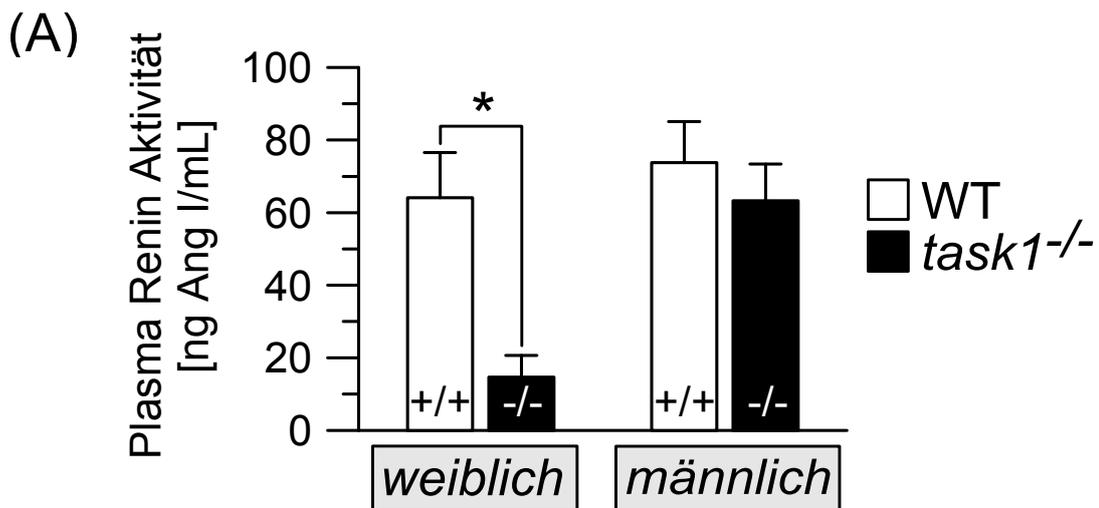
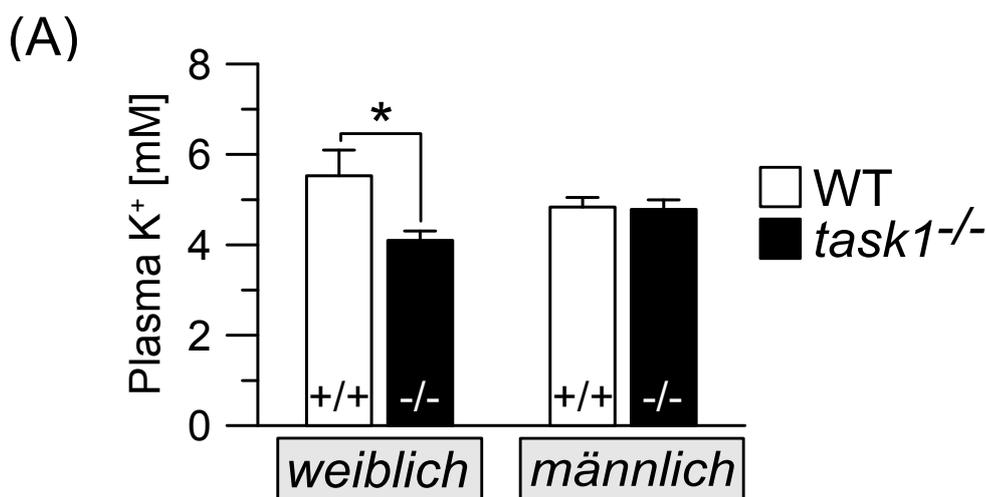


Abb. 7(↑): Renin-Aktivität im Plasma und renale Renin-Expression

Weibliche *task1*^{-/-} Mäuse (n=10) zeigten, verglichen mit den Wildtypmäusen (n=10), eine deutlich verringerte Renin-Aktivität im Plasma (A), sowie eine verminderte Renin-spezifische Immunfluoreszenzfärbung (B) in der Niere (gesamt, n=10). In Männchen war die Renin-Aktivität in beiden Genotypen ähnlich (gesamt, n=15). Bei weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen liegt demnach ein Renin-unabhängiger Hyperaldosteronismus vor.

4.1.3 Hypokaliämie und ENaC-Aktivierung bei weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen

Aldosteron stimuliert die K⁺-Sekretion und die Na⁺-Reabsorption in den entsprechenden Zielorganen, so dass eine gestörte Regulation der Aldosteronsekretion mit Störungen des K⁺- und Na⁺-Haushalts einhergehen kann. Ein typisches Merkmal des primären Hyperaldosteronismus ist die Hypokaliämie. Auch der Hyperaldosteronismus der weiblichen *task1*^{-/-} Mäuse wurde von einer relativen Hypokaliämie begleitet. Während die K⁺-Konzentration im Plasma der männlichen Mäusen unabhängig vom Genotyp war, wurde bei den weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen eine signifikant kleinere K⁺-Konzentration als bei den Wildtypmäusen gemessen (Abb. 8A). Dagegen war die Na⁺-Konzentration im Plasma zwischen den Genotypen nicht verschieden (nicht gezeigt). Allerdings kam es in der Mukosa des distalen Kolons von weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen zu einer Aktivierung des Na⁺- Transports durch den epithelialen Na⁺-Kanal (ENaC), was mit Hilfe von Ussing-Kammer-Experimenten beobachtet werden konnte (Abb. 8B und C).



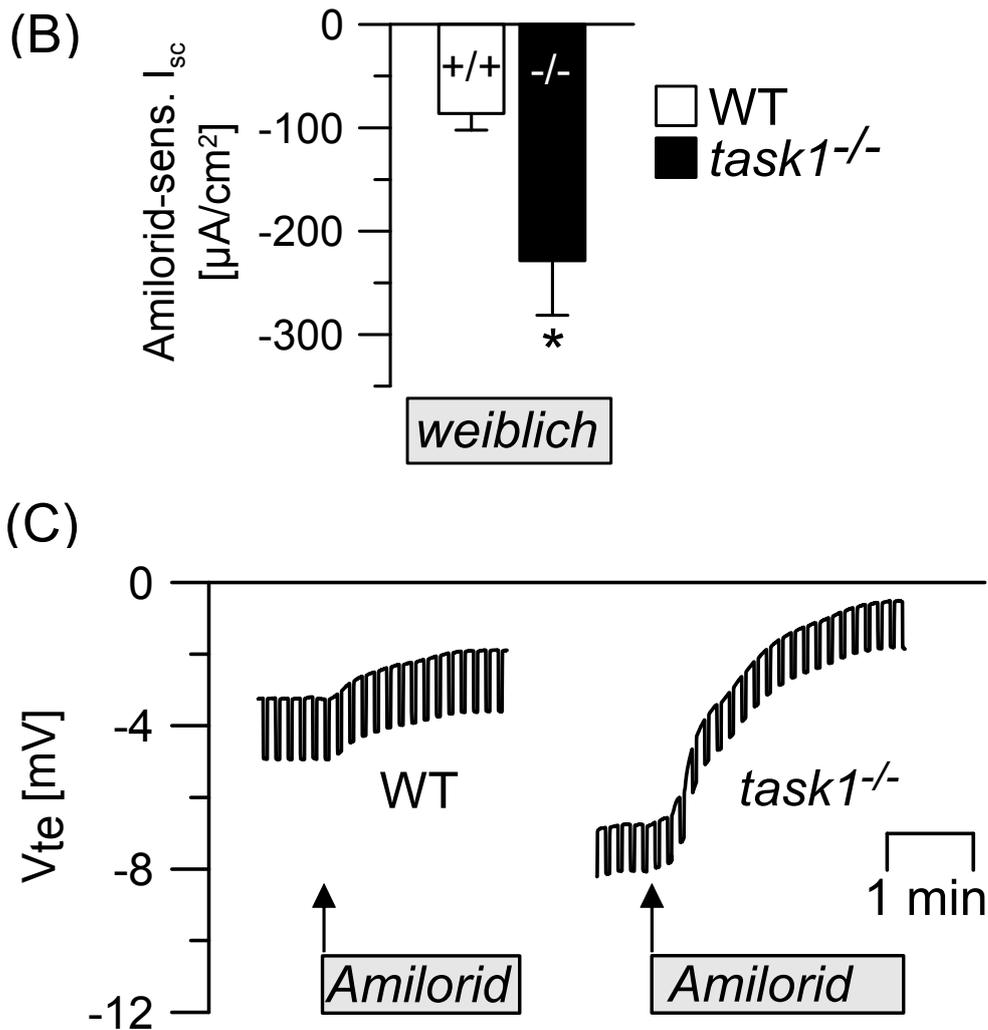


Abb. 8: Plasma K^+ und ENaC-Aktivität im distalen Kolon

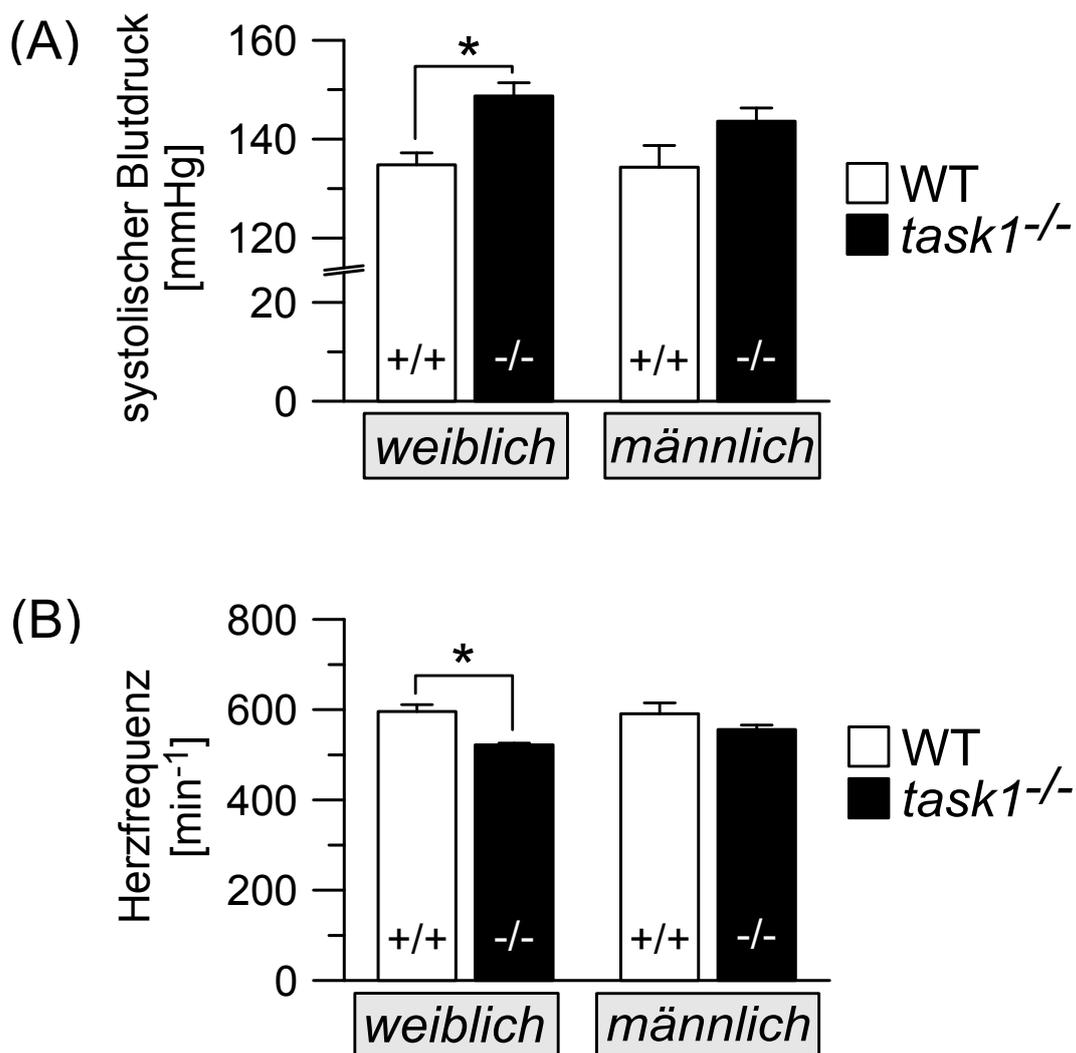
(A↑) Es wurde die Konzentration von K^+ im Plasma von männlichen und weiblichen Wildtypmäusen und $task1^{-/-}$ Mäusen gemessen. Weibliche $task1^{-/-}$ Mäuse ($n=7$) wiesen eine relative Hypokaliämie auf, während männliche $task1^{-/-}$ Mäuse ($n=8$) normale Plasma K^+ -Werte hatten. (B) Ussing-Kammer-Experimente mit der Mukosa des distalen Kolons: Der Amilorid-empfindliche Kurzschlussstrom (I_{sc}), als Maß für die ENaC-abhängige Na^+ -Reabsorption, war in weiblichen $task1^{-/-}$ Mäusen signifikant erhöht (gesamt, $n=14$). Ein Originalexperiment, das den Effekt der luminalen Amiloridgabe (10 μM) auf das transepitheliale Potential (V_{te}) zeigt, ist in (C) dargestellt. *bedeutet statistisch signifikant verschieden von Wildtypmäusen.

4.1.4 Hypertension bei weiblichen $task1^{-/-}$ Mäusen als Folge des Hyperaldosteronismus

Eine gesteigerte Na^+ -Rückresorption bei Hyperaldosteronismus kann Bluthochdruck verursachen. Um diesen Effekt in den weiblichen $task1^{-/-}$ Mäusen zu überprüfen, wurden Blutdruckmessungen mit Hilfe einer Schwanzmanschette durchgeführt. Der systolische Blutdruck von männlichen $task1^{-/-}$ Mäusen und Wildtypmäusen unterschied sich nicht signifikant voneinander. Dagegen war der systolische Blutdruck bei weiblichen $task1^{-/-}$ Mäusen 15 mmHg höher als bei Wildtypmäusen (Abb. 9A). Dieser Blutdruckanstieg

wurde von einer signifikanten Bradykardie begleitet und somit wahrscheinlich nicht durch einen höheren Tonus des Sympathikus verursacht. Bei männlichen Mäusen konnte kein Unterschied in der Herzfrequenz beobachtet werden (Abb. 9B).

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der erhöhten Aldosteronkonzentration auf die Entstehung des arteriellen Hochdrucks bei weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen untersucht. Dazu wurde den Mäusen der Aldosteronrezeptorblocker Canrenoat für 10 Tage über das Trinkwasser (1.25 g/L) verabreicht und an den letzten 5 Tagen dieser Periode der arterielle Blutdruck gemessen. Unter Kontrollbedingungen zeigten weibliche *task1*^{-/-} Mäuse, wie zuvor beschrieben, einen höheren systolischen Blutdruck als die Wildtypmäuse. Die Behandlung mit Canrenoat führte nur in den *task1*^{-/-} Mäusen aber nicht in den Wildtypmäusen zu einem Abfall des systolischen Blutdrucks (Abb. 9C). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Ursache für den arteriellen Hochdruck bei weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen offensichtlich eine durch Aldosteron induzierte Expansion des extrazellulären Volumens ist.



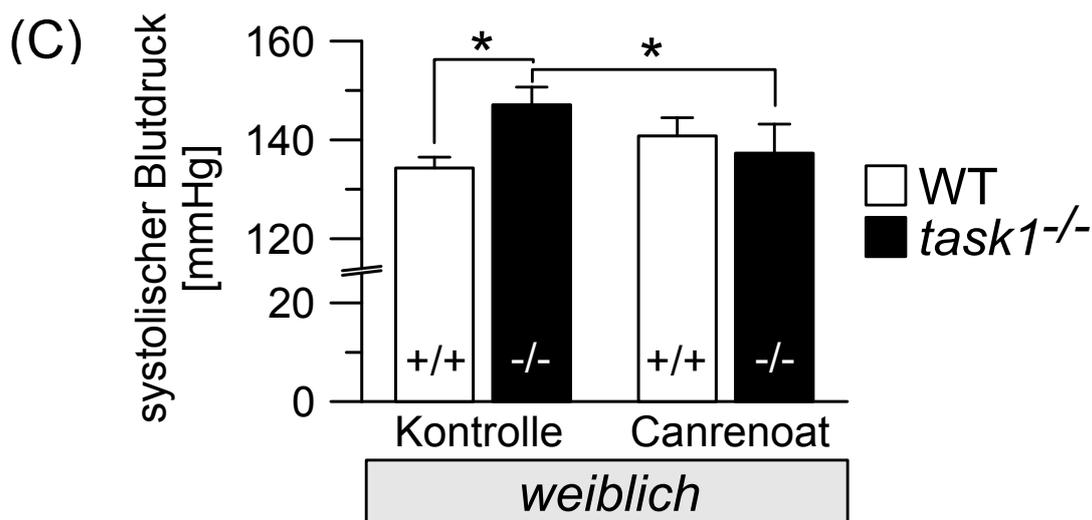


Abb. 9: Blutdruck und Herzfrequenz, Einfluss des Aldosteron-Antagonisten Canrenoat

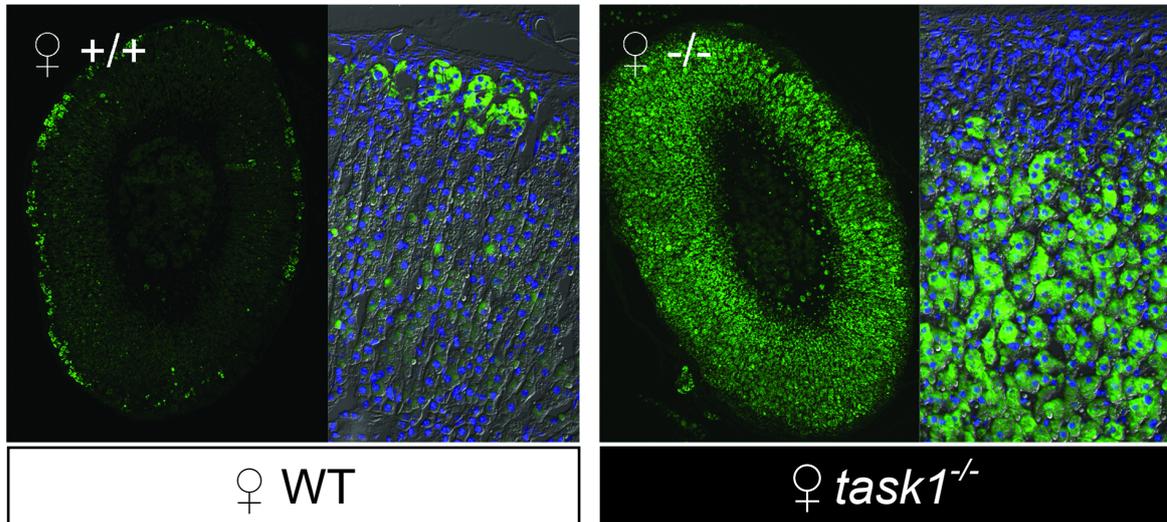
(A↑) In Blutdruckmessungen mit Hilfe von Schwanzmanschetten zeigten weibliche *task1*^{-/-} Mäuse verglichen mit Wildtypmäusen einen höheren systolischen Blutdruck (gesamt, n=20). Männliche *task1*^{-/-} Mäuse wiesen nur tendenziell höhere Blutdruckwerte auf (P=0.067; gesamt, n=20). (B↑) Die Herzfrequenz war in den weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen (n=10) geringer als in den Wildtypmäusen (n=10). In männlichen Mäusen war die Herzfrequenz zwischen den beiden Genotypen nicht verschieden (P=0.20; gesamt, n=20). (C) Die Hemmung des Mineralokortikoidrezeptors durch Canrenoat normalisierte den systolischen Blutdruck der weiblichen *task1*^{-/-} Mäuse (n=12, gepaarte Experimente). *Bedeutet statistisch signifikant verschieden.

4.1.5 Lokalisation der Aldosteron-produzierenden Zellen in der Nebennierenrinde

Als Ursache des Hyperaldosteronismus von weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen kam eine erhöhte Aldosteronsekretion durch Zellen der Zona glomerulosa in der Nebennierenrinde in Frage. Der letzte Schritt der Aldosteronsynthese wird durch die Aldosteronsynthase (CYP11B2) katalysiert. Dementsprechend sollte ein Anstieg in der Expression dieses Enzyms bei ausreichendem Substratangebot zu einer verstärkten Aldosteronsynthese führen. Interessanterweise zeigten Immunfluoreszenzfärbungen mit Hilfe eines Antikörpers gegen die Aldosteronsynthase einen geschlechtsabhängigen Einfluss der TASK1-Deletion auf die Lokalisation der Aldosteronsynthase innerhalb der Nebennierenrinde. In Wildtypmäusen beider Geschlechter wurde die Aldosteronsynthase nur in den Zellen der Zona glomerulosa exprimiert (Abb. 10A und B, links). In weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen war in der Zona glomerulosa dagegen keine Expression der Aldosteronsynthase nachweisbar. Dafür tauchten in tieferen Schichten der Nebennierenrinde (Zona fasciculata bis Zona reticularis) Zellen auf, die sich durch eine Färbung der Aldosteronsynthase auszeichneten (Abb. 10A, rechts). Das heißt, durch die Deletion von TASK1 kam es in den weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen hinsichtlich der Expression der Aldosteronsynthase zu einer Aufhebung der

typischen Zonierung der Nebennierenrinde. Im Gegensatz dazu wiesen männliche *task1*^{-/-} Mäuse nicht diese veränderte Lokalisation der Aldosteronsynthase auf (Abb. 10B, rechts).

(A)



(B)

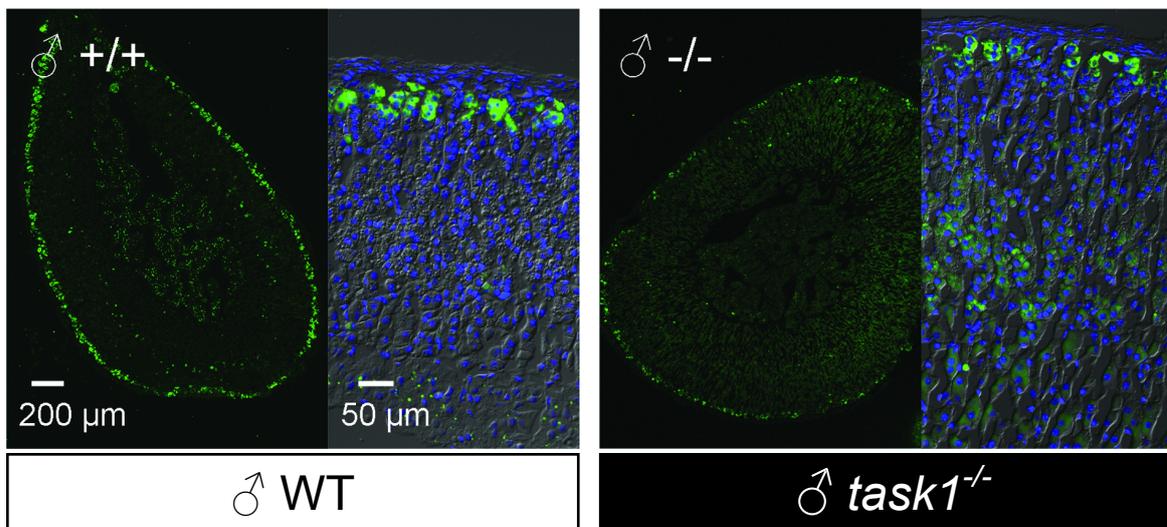
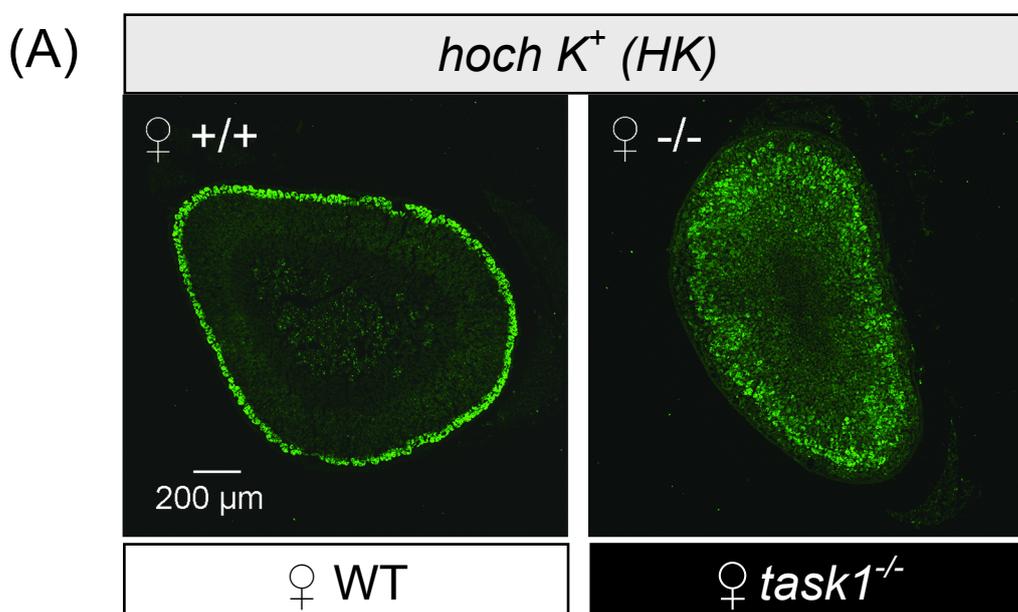


Abb. 10: Immunfluoreszenzfärbungen der Aldosteronsynthase in Nebennieren adulter Mäuse

Die Lokalisation der Aldosteronsynthase (grün) in der Nebenniere von adulten Wildtypmäusen und *task1*^{-/-} Mäusen wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. In der Überlagerung der Bilder werden gleichzeitig die Zellkerne in blauer Farbe (Kernfärbung mit HOE33342) und ein Interferenzkontrast-Bild in Graustufen dargestellt. Neben einer Übersichtsaufnahme wird jeweils eine höhere Vergrößerung des adrenalen Kortex gezeigt. In adulten Wildtypmäusen (**linke Seite A und B**) war die Aldosteronsynthasefärbung unabhängig vom Geschlecht beschränkt auf Zellen der Zona glomerulosa der äußeren Nebennierenrinde. Das gleiche Expressionsmuster wiesen männliche *task1*^{-/-} Mäuse auf (**rechte Seite B**). Dagegen fehlte in weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen die typische Färbung der Aldosteronsynthase und tauchte stattdessen als breite Färbung in inneren Anteilen des adrenalen Kortex auf (**rechte Seite A**).

4.1.6 Einfluss von K^+ auf die Expression und Lokalisation der Aldosteronsynthese

Eine hohe Konzentration von K^+ im Plasma induziert bekanntermaßen die Expression der Aldosteronsynthese in der Zona glomerulosa. Bei den weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen war die Aldosteronsynthese nicht in den Glomerulosazellen nachweisbar. Deshalb wurde untersucht, ob die Expression der Aldosteronsynthese in den Nebennieren von weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen der normalen Regulation unterliegt und durch eine K^+ -reiche Diät stimuliert werden kann. Dazu wurden von Nebennieren aus Mäusen unter K^+ -reicher Diät Immunfluoreszenzfärbungen und Western Blot Analysen der Aldosteronsynthese angefertigt. Zusätzlich sollte die Immunfluoreszenzfärbung Aufschluss darüber geben, ob die K^+ -reiche Diät dabei auch Einfluss auf die veränderte Zonierung der Nebennieren von weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen hat. In weiblichen Wildtypmäusen führte die K^+ -reiche Diät zu einem deutlichen Anstieg der Expression der Aldosteronsynthese in der Zona glomerulosa (Abb. 11A und B, links). Dagegen konnte diese Reaktion nicht in den weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen beobachtet werden (Abb. 11A und B, rechts). Die veränderte Zonierung der Nebennieren weiblicher *task1*^{-/-} Mäuse wurde durch die K^+ reiche Diät nicht beeinflusst (Abb. 11A, rechts). Die Quantifizierung der Expression der Aldosteronsynthese mRNA mittels Realtime PCR zeigte ebenfalls eine Stimulation durch die K^+ reiche Diät in den Nebennieren der Wildtypmäusen aber nicht in den weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich ist die Expression der Aldosteronsynthese in den weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen, ebenso wie die Aldosteronkonzentration im Plasma, unabhängig von der angebotenen Salzdiät und unterliegt damit nicht der normalen physiologischen Regulation durch Ang II und hohes Plasma K^+ .



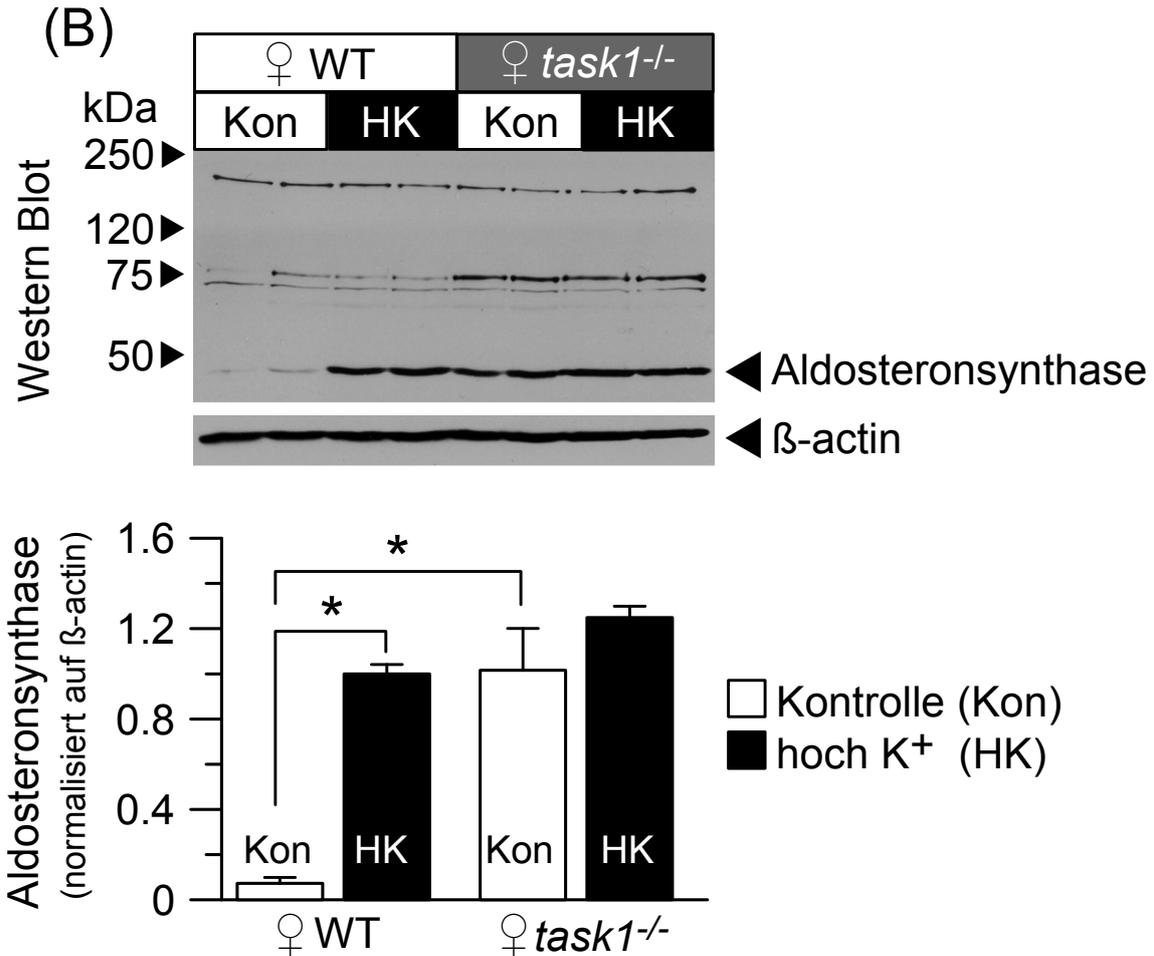


Abb. 11: Lokalisation und Expressionsstärke der Aldosteronsynthase bei K⁺-reicher Diät

(A↑) Immunfluoreszenzfärbung der Aldosteronsynthase (grün) in Nebennieren adulter weiblicher Mäusen unter hoch-K⁺ Diät: In weiblichen Wildtypmäusen (linke Seite) verursachte eine K⁺-reiche Diät einen deutlichen Anstieg der Färbung der Aldosteronsynthase in den Glomerulosazellen. In weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen (rechte Seite) veränderte die K⁺-reiche Diät die Lokalisation und Expressionsstärke der Aldosteronsynthase nicht. (B) Western Blot Analysen der Proteinexpression der Aldosteronsynthase in Nebennieren unter Kontrolldiät (Kon) und hoch-K⁺ Diät (HK): Der obere Teil der Abbildung zeigt einen typischen Blot (die höhermolekularen Banden sind vermutlich unspezifisch). Im unteren Teil des Bildes ist die Quantifizierung der Proteinexpression der Aldosteronsynthase dargestellt (normalisiert auf β-Actin; Wildtypmäuse n=8; *task1*^{-/-} Mäuse n=8). Weibliche Wildtypmäuse weisen unter Kontrolldiät nur eine geringe Proteinexpression der Aldosteronsynthase auf, die durch hoch-K⁺ deutlich stimulierbar ist. Bei *task1*^{-/-} Mäusen findet man schon unter Kontrolldiät ein Expressionsstärke der Aldosteronsynthase wie bei Wildtypmäusen unter hoch K⁺ Diät. Das heißt, die hoch-K⁺ Diät führt bei *task1*^{-/-} Mäusen zu keiner weiteren Steigerung der Expression. *bedeutet statistisch signifikant verschieden von der Kontrolldiät bzw. zwischen Wildtyp und *task1*^{-/-}.

4.1.7 Aufhebung des Hyperaldosteronismus durch Glukokortikoidbehandlung

Die Lokalisation der Aldosteronsynthese in der Zona fasciculata und der Verlust der normalen Regulation der Aldosteronsekretion in den weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen führte zu der Frage, ob die Aldosteronsekretion in diesen Mäusen vielleicht nicht unter der Kontrolle von Ang II steht, sondern durch ACTH beeinflusst wird. Um das zu klären, wurde weiblichen Mäusen zur Senkung der Konzentration von ACTH im Plasma drei Tage lang Dexamethason injiziert (6 mg/kg s.c.). Dexamethason ist als Glukokortikoid wirksam und hemmt in der verabreichten Konzentration die Ausschüttung von ACTH aus der Hypophyse im Sinne einer negativen Rückkopplung. Die Behandlung mit Dexamethason führte zu einer deutlichen Abnahme der Aldosteronkonzentration in weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen, während Wildtypmäusen ähnlich niedrige Werte erreichten (Abb. 12). Somit war der Hyperaldosteronismus der weiblichen *task1*^{-/-} Mäuse vollständig durch Behandlung mit dem Glukokortikoid Dexamethason aufhebbar. Die Expression der Aldosteronsynthase scheint in den weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen unter der Kontrolle von ACTH zu stehen.

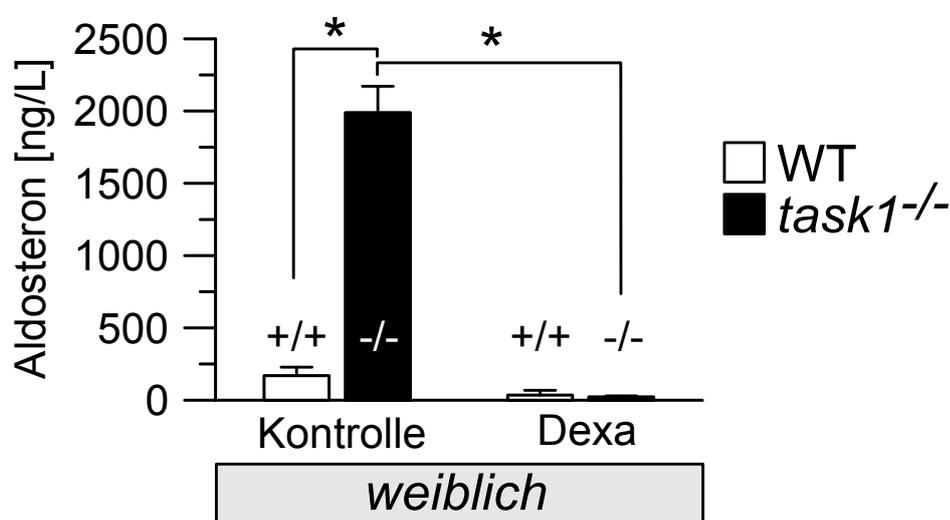


Abb. 12: Einfluss des Glukokortikoids Dexamethason auf die Plasma-Aldosteronkonzentration
Die Aldosteronkonzentration im Plasma wurde in weiblichen Wildtypmäusen (n=6) und *task1*^{-/-} Mäusen (n=6) vor (Kontrolle) und nach Behandlung mit Dexamethason (Dexa) bestimmt. Dexamethason führt zu einer völligen Aufhebung des Hyperaldosteronismus der *task1*^{-/-} Mäuse, die dadurch gleich niedrige Aldosteronwerte wie die Wildtypmäuse erreichen. Vermutlich steht die Expression der Aldosteronsynthase in der Zona fasciculata der *task1*^{-/-} Mäuse unter der Kontrolle von ACTH, da Dexamethason in der verabreichten Konzentration zu einer Hemmung der ACTH-Ausschüttung führt. *Bedeutet statistisch signifikant verschieden von Wildtypmäusen

4.1.8 Corticosteronsynthese in der Nebenniere

Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, ist bei Mäusen Corticosteron, welches in der Zona fasciculata synthetisiert wird, das wichtigste Glukokortikoid. Deshalb wurde untersucht, ob das Auftreten von Aldosteron-produzierenden Zellen in der Zona fasciculata der weiblichen *task1*^{-/-} Mäuse einen Einfluss auf die Corticosteronsynthese hat. Dazu wurde die mRNA Expression der 11 β -Hydroxylase (CYP11B1), welche 11-Desoxycorticosteron zu Corticosteron umsetzen kann, in den Nebennieren mit Hilfe der Realtime PCR quantifiziert. Es wurde hierbei kein Unterschied in der Expression von CYP11B1 zwischen Wildtypmäusen und *task1*^{-/-} Mäusen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigten weibliche Wildtypmäuse eine dreimal so hohe Expression von CYP11B1 wie männliche Mäuse, was mit schon publizierten Daten übereinstimmt (Bielohuby, 2007). Die Konzentration von Corticosteron im Plasma war bei beiden Genotypen gleich (weiblich *task1*^{+/+} 391 \pm 35 μ g/l, n=20; weiblich *task1*^{-/-} 341 \pm 26 μ g/l, n=41). Die Lokalisation der Aldosteronsynthese in der Zona fasciculata der Nebennieren weiblicher *task1*^{-/-} Mäuse führte also nicht zu einer Veränderung der Corticosteronsynthese.

4.1.9 Alters- und geschlechtsabhängige Zonierung der Nebennierenrinde

Offensichtlich gibt es Mechanismen, die zwar eine Kompensation des fehlenden TASK1-Kanals in den adulten männlichen, aber nicht in den weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen ermöglichen. Die im Folgenden beschriebenen Versuche sollten mögliche Ursachen, die zur Ausbildung der geschlechtsabhängigen Zonierung der Nebennierenrinde bei *task1*^{-/-} Mäusen führen, aufdecken.

Die Nebennieren von weiblichen und männlichen Mäusen wurden untersucht, bevor die Mäuse die Pubertät erreichten. Direkt nach der Geburt bestand, wie bei den Wildtypmäusen, auch bei *task1*^{-/-} Mäusen unabhängig vom Geschlecht eine normale Zonierung der Nebenniere (Abb.13, 1d). Erst während der ersten 1. Lebenswoche ging die spezifische Expression der Aldosteronsynthese in der Zona glomerulosa der Nebennieren von weiblichen und männlichen *task1*^{-/-} Mäusen verloren. Während die untersuchten 7, 14 und 21 Tage alten Wildtypmäuse ein normales Zonierungsmuster aufwiesen, blieb bei *task1*^{-/-} Mäusen die gestörte Zonierung mit der Expression der Aldosteronsynthese in der Zona fasciculata unabhängig vom Geschlecht bis zum Erreichen der Pubertät bestehen (Abb. 13, obere Reihe). Das veränderte Expressionsmuster der Aldosteronsynthese in der

Nebennierenrinde der *task1^{-/-}* Mäuse entwickelte sich also erst nach der Geburt und war bei den männlichen *task1^{-/-}* Mäusen reversibel.

Um den Einfluss der Geschlechtshormone auf die adrenokortikale Zonierung der *task1^{-/-}* Mäuse weiter aufzuklären, wurde die Lokalisation der Aldosteronsynthese in kastrierten männlichen Mäusen untersucht (Abb. 14A). Die Kastration wurde bei fünf Wochen alten Mäusen vorgenommen. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die unkastrierten männlichen *task1^{-/-}* Mäuse noch eine veränderte Zonierung der Nebenniere auf. Nach der Kastration wurde ein Teil der Mäuse zusätzlich mit Östrogen behandelt. Im Alter von zehn Wochen zeigten die kastrierten Wildtypmäuse eine normale Zonierung, die unabhängig von der Östrogenbehandlung war. Die zur Kontrolle operierten, aber nicht kastrierten *task1^{-/-}* Mäuse wiesen ebenfalls eine normale Zonierung auf. Dagegen verhinderte die Kastration bei den männlichen *task1^{-/-}* Mäusen die Ausbildung einer normalen Zonierung der Nebennieren. Die gleichzeitige Behandlung mit Östrogen schien dabei die absolute Expression der Aldosteronsynthese zu verringern, ohne aber das normale Zonierungsmuster eindeutig wiederherzustellen.

Um die Bedeutung der Androgene für die Entwicklung der Nebenniere zu verifizieren, wurden weibliche *task1^{-/-}* Mäuse mit Testosteron behandelt (Abb. 14B). Dadurch war es möglich, auch in weiblichen *task1^{-/-}* Mäusen die normale Lokalisation der Aldosteronsynthese in der Zona glomerulosa zu induzieren. Diese Daten erhärten die Vermutung, dass die Kompensationsmechanismen, die eine normale Zonierung der Nebennierenrinde in den adulten männlichen *task1^{-/-}* Mäusen ermöglichen, abhängig von Testosteron sind.

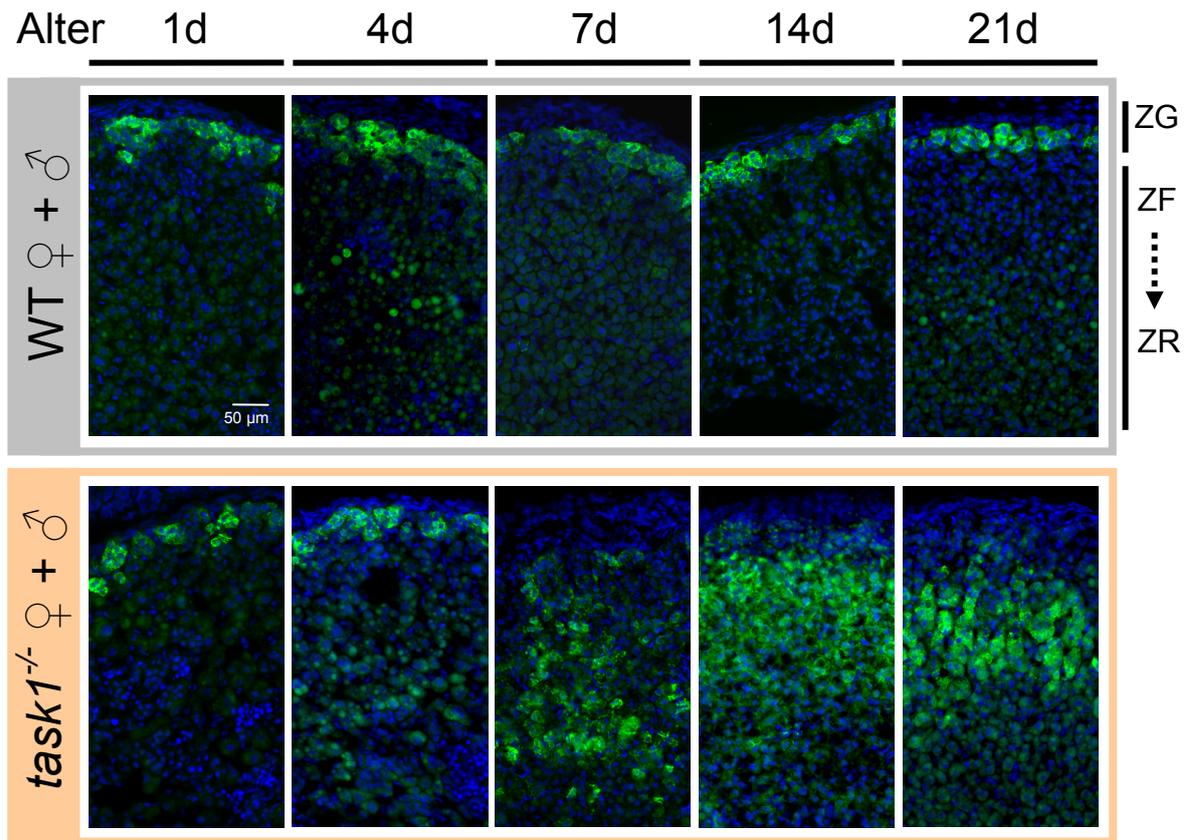
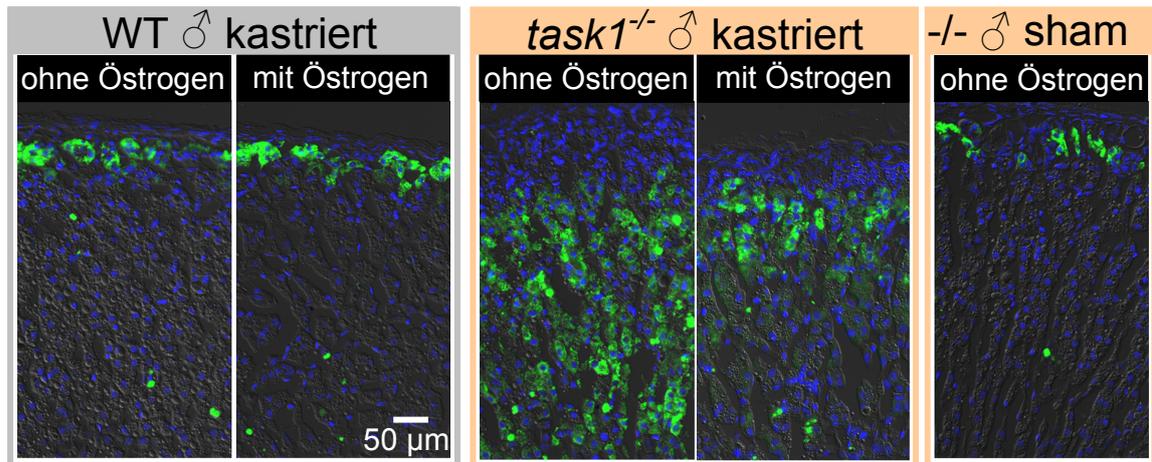
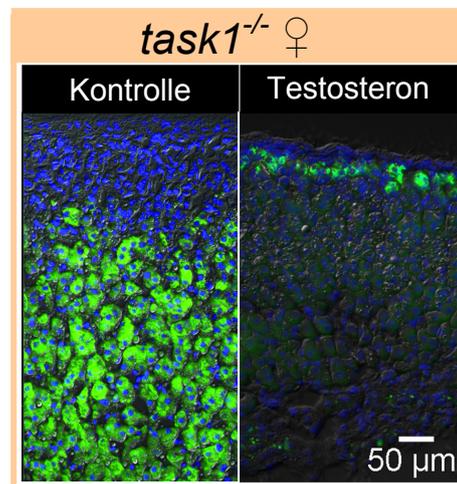


Abb. 13: Altersabhängige Lokalisation der Aldosteronsynthase in der Nebenniere (WT/*task1*^{-/-})
 Immunfluoreszenzfärbungen der Aldosteronsynthase (grün; Kernfärbung mit HOE33342 in blau) in Nebennieren von jungen weiblichen und männlichen Wildtypmäusen und *task1*^{-/-} Mäusen unter Kontrolldiät. Die Tiere wurden jeweils am 1., 4., 7., 14. und 21. Tag nach der Geburt mit PFA fixiert. Direkt nach der Geburt zeigten Wildtypmäuse und *task1*^{-/-} Mäuse geschlechtsunabhängig eine normale Zonierung mit Expression der Aldosteronsynthase in Zellen der Zona glomerulosa. Innerhalb der 1. Lebenswoche bildete sich bei weiblichen und männlichen *task1*^{-/-} Mäusen (untere Bildreihe) im Gegensatz zu den Wildtypmäusen (oberer Bildreihe) eine gestörte Zonierung der Nebenniere aus, die durch Expression der Aldosteronsynthase in tieferen Schichten des adrenalen Kortex gekennzeichnet ist. Die Expression in der Zona glomerulosa ging hingegen verloren. Die Zonierungsstörung der Nebenniere von *task1*^{-/-} Mäusen bildet sich demnach erst nach der Geburt aus und ist bis zum Erreichen der Pubertät in beiden Geschlechter vorhanden, während sie sich bei adulten Männchen wieder zurückbildet. ZG (Zona glomerulosa), ZF (Zona fasciculata), ZR (Zona reticularis)

(A)



(B)

**Abb. 14: Einfluss von Kastration, Östrogen und Testosteron auf die Nebennierenzonierung**

Immunfluoreszenzfärbungen der Aldosteronsynthase (grün; Kernfärbung mit HOE33324 in blau, Interferenzphasenkontrast in Graustufen) in Nebennieren von adulten Wildtypmäusen (WT) und *task1*^{-/-} Mäusen: **(A)** Fünf Wochen alte männliche Mäuse wurden kastriert bzw. scheinoperiert (sham) und anschließend teilweise für 5 Wochen mit Östrogen (Estradiolbenzoat; 4 µg/g/Tag, s.c.) behandelt. In männlichen Wildtypmäusen hatte die Kastration (mit oder ohne Östrogen-Behandlung) keinen Einfluss auf die adrenokortikale Zonierung. Zur Kontrolle operierte aber nicht kastrierte männliche *task1*^{-/-} Mäuse zeigten ebenfalls eine normale Zonierung. Dagegen verhinderte die Kastration die normale Zonierung in männlichen *task1*^{-/-} Mäusen und führte zu einer Verlagerung der Aldosteronsynthase-Expression von der Zona glomerulosa hin zu tieferen adrenokortikalen Schichten. Östrogen schien die Expression der Aldosteronsynthase zu verringern, ohne die Expression in der Zona glomerulosa wiederherzustellen. **(B)** Vier Wochen alte *task1*^{-/-} Weibchen wurden ab der 4. Lebenswoche 3 Wochen lang mit Testosteron (2x pro Woche 1 mg in 50 µL Sesamöl, s.c.) behandelt. Die Testosteron-Behandlung induzierte in den weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen eine normale Zonierung der Nebenniere, während unbehandelte Mäuse (wie in Abb. 5 gezeigt wurde) eine Fehllokalisierung der Aldosteronsynthase aufwiesen. Dies unterstreicht die Bedeutung der Androgene für die adrenokortikale Rezonierung in adulten männlichen *task1*^{-/-} Mäusen.

4.1.10 Elektrophysiologische Eigenschaften der adrenokortikalen Zellen

Offensichtlich waren die adulten männlichen *task1*^{-/-} Mäuse in der Lage, den Verlust von TASK1 auszugleichen und nach der Pubertät eine normale Funktion der Nebennierenrinde auszubilden. Die Aldosteronsekretion in den Glomerulosazellen der adulten männlichen *task1*^{-/-} Mäuse unterlag anscheinend den normalen Regulationsmechanismen, wie durch die Behandlung mit verschiedenen Salzdiäten gezeigt werden konnte.

Um diesen Kompensationsmechanismus aufzuklären, wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften primär kultivierter adrenokortikaler Zellen aus adulten männlichen Wildtypmäusen und *task1*^{-/-} Mäusen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik im Whole-Cell-Modus untersucht. Dadurch sollte der Anteil der TASK1-Kanäle an der Ganzzellleitfähigkeit und der Anteil der TASK1-Kanäle an der durch Ang II induzierten Membrandepolarisation bestimmt werden. Zellen von *task1*^{-/-} Mäusen hatten unter Ruhebedingungen ein stärker depolarisiertes Membranpotential als Zellen der Wildtypmäuse. TASK-Kanäle werden durch einen sauren pH-Wert gehemmt. Im Gegensatz zu den Wildtypzellen zeigten die *task1*^{-/-} Zellen zwar keine signifikante Änderung der Ganzzellleitfähigkeit durch einen sauren extrazellulären pH-Wert. Allerdings kam es in den *task1*^{-/-} Zellen bei pH 6 trotzdem zu einer Depolarisation des Membranpotentials, da dieses offensichtlich stärker durch kleine Änderungen der K⁺-Leitfähigkeit beeinflusst wird als die Ganzzellleitfähigkeit. Diese Reaktion auf die Änderung des pH-Wertes spricht für die Expression anderer säureempfindlicher K⁺-Kanäle (z.B. homomere TASK3-Kanäle) in den *task1*^{-/-} Zellen (Abb. 15). Ang II hemmte die Ganzzellleitfähigkeit und führte zu einer Membrandepolarisation bei Wildtypzellen und *task1*^{-/-} Zellen. Interessanterweise war der Effekt durch Ang II größer als jener durch einen sauren extrazellulären pH-Wert. Ang II hemmt also vermutlich neben den TASK-artigen Kanälen auch säureunempfindliche Kanäle.

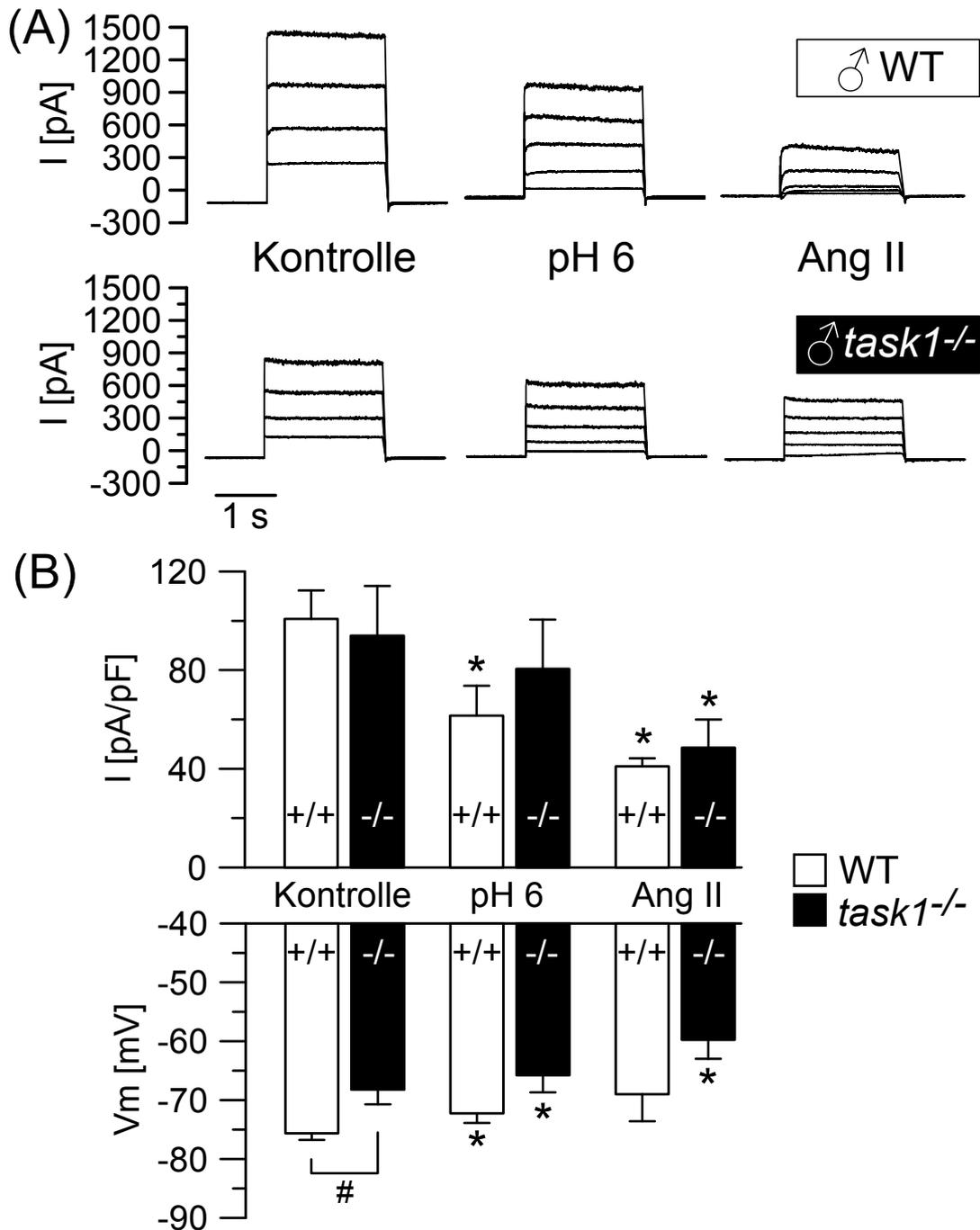


Abb. 15: Patch-Clamp-Messungen im Whole-cell-Modus an adrenokortikalen Zellen

Dargestellt ist der Einfluss von pH 6 und Ang II auf den Ganzzellstrom (*I*) und das Membranpotential (*V_m*) von primär kultivierten Zellen aus Nebennieren adulter männlicher Wildtypmäuse und *task1*^{-/-} Mäuse: **(A)** Typische Superposition der Ströme einer Wildtypzelle (obere Aufzeichnung) und einer *task1*^{-/-} Zelle (untere Aufzeichnung) unter Kontrolle, saurem extrazellulärem pH 6 bzw. nach Stimulation mit Ang II (1nM). Die Zellen wurden von -95 bis +30 mV in 25 mV Schritten geklemmt. **(B)** Zusammenfassung der Patch-Clamp-Experimente: Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Ganzzellströme (gemessen am Spannungssprung von -95 auf +30 mV) auf die Zellkapazität normalisiert (pA/pF; oberes Bild). Das Membranpotential wurde im cc-zero Modus gemessen (unteres Bild). Zellen aus *task1*^{-/-} Mäusen hatten ein stärker depolarisiertes Membranpotential als Wildtypzellen; pH 6 und Ang II führten beim WT zur Depolarisation und Hemmung der Leitfähigkeit. Bei *task1*^{-/-} fehlte der Effekt von pH 6 auf die Leitfähigkeit, während der Einfluss auf das Membranpotential und der Effekt von Ang II nicht durch die TASK1-Deletion verändert wurde. *statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle #statistisch signifikanter Unterschied zwischen Wildtypzellen und *task1*^{-/-} Zellen.

4.2 Untersuchung des adrenalen Phänotyps der *task3*^{-/-} Mäuse

Ergänzend zu unseren Arbeiten über die *task1*^{-/-} Maus konnte die Arbeitsgruppe von Barrett (Davies, 2008) bei männlichen Mäusen, denen sowohl TASK1 als auch TASK3 fehlte, einen Hyperaldosteronismus nachweisen (weibliche Mäuse wurden nicht untersucht). Dieser war allerdings nicht so ausgeprägt wie bei den weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen. Außerdem wiesen die männlichen *task1/3*^{-/-} Mäuse eine normale adrenokortikale Zonierung auf. Diese Daten zeigen einerseits, dass TASK3 einen Anteil am Kompensationsmechanismus der adulten männlichen *task1*^{-/-} Mäuse zu haben scheint, da die zusätzliche Deletion von TASK3 bei den männlichen *task1/3*^{-/-} Mäusen einen Hyperaldosteronismus verursachte. Andererseits müssen weitere Faktoren die normale Zonierung der Nebenniere bei adulten männlichen *task1*^{-/-} Mäusen ermöglichen, da der zusätzliche Wegfall von TASK3 keinen Einfluss auf die Zonierung hatte.

Um zu klären, welchen Anteil der TASK3 Kanal am Phänotyp des Doppelknockouts hat und welche Rolle TASK3 für die normale Nebennierenfunktion spielt, wurden weitere Experimente an *task3*^{-/-} Mäusen durchgeführt.

4.2.1 Plasma-Aldosteron adulter *task3*^{-/-} Mäuse unter verschiedenen Salzdiäten

Analog zu den Experimenten mit den *task1*^{-/-} Mäusen wurde auch bei den *task3*^{-/-} Mäusen der Salzgehalt der Nahrung variiert, um den Einfluss physiologischer Regulatoren der Aldosteronsekretion zu überprüfen. Zusätzlich zu der hoch-K⁺, niedrig-K⁺ bzw. niedrig-Na⁺ Diät wurde auch eine niedrig-Na⁺ Diät bei gleichzeitiger Gabe des Ang II-Rezeptorblockers Losartan über das Trinkwasser (30 mg/kg Mausgewicht innerhalb 24h) verabreicht. Mit Hilfe dieses Inhibitors sollte geklärt werden, in welchem Maße von Ang II unabhängige Wege der Aldosteronsekretion durch die Deletion von TASK3 beeinflusst werden. Adulte Wildtypmäuse sowie *task3*^{-/-} Mäuse (beide Geschlechter) reagierten auf eine niedrig-Na⁺ Diät mit einem gleich großen Anstieg der Aldosteronkonzentration im Plasma, der jeweils in gleichem Maße durch Gabe von Losartan gehemmt werden konnte. Dagegen war bei einer K⁺-reichen Diät in den knockout Mäusen ein deutlich abgeschwächter Anstieg der Aldosteronkonzentration zu beobachten (Abb. 16). Möglicherweise führt die Erhöhung der K⁺-Konzentration im Plasma durch die K⁺-reiche Diät in den Glomerulosazellen der *task3*^{-/-} Mäuse zu einer geringeren Depolarisation als in den Zellen der Wildtypmäuse. Daraus könnte eine reduzierte Stimulation der Aldosteronsekretion in den *task3*^{-/-} Mäusen resultieren. Auf die niedrig-K⁺ Diät reagierten

beide Genotypen mit einem Abfall der Aldosteronkonzentration im Plasma, wobei die Wildtypmäuse in der Tendenz eine stärkere Abnahme aufwiesen, als die *task3*^{-/-} Mäuse.

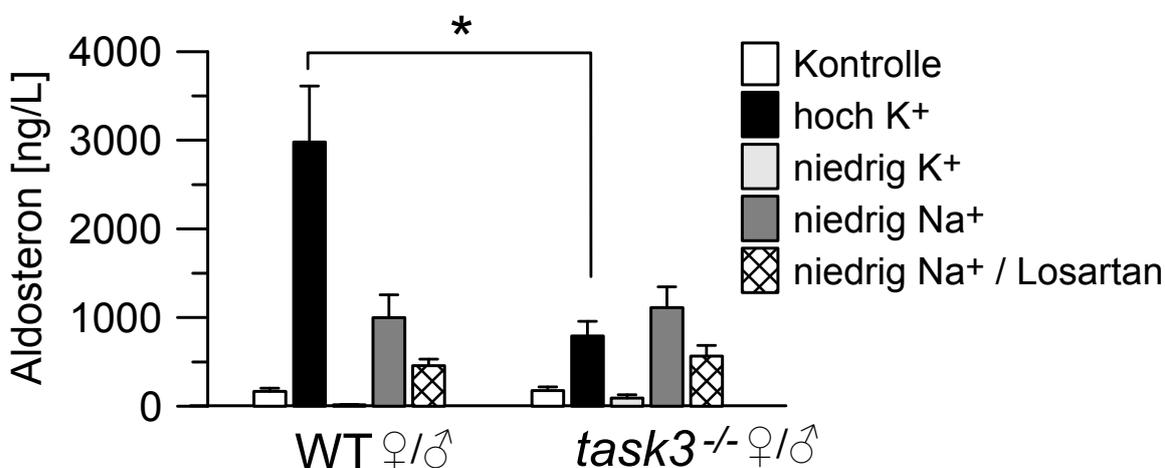


Abb. 16: Plasma-Aldosteron unter verschiedenen Salzdiäten (Einfluss von TASK3)

Dargestellt ist der Einfluss der TASK3-Deletion auf die Aldosteronkonzentration im Plasma adulter Mäuse in Abhängigkeit von der aufgenommenen Na⁺- und K⁺-Menge, sowie der Einfluss des Ang II-Rezeptor-Blockers Losartan. Da keine geschlechtsabhängigen Unterschiede bestanden, wurden die Daten der männlichen und weiblichen Mäuse zusammengefasst. Wildtypmäuse und *task3*^{-/-} Mäuse reagierten geschlechtsunabhängig mit einem Anstieg der Aldosteronkonzentration unter niedrig-Na⁺, der bei beiden Genotypen durch gleichzeitige Gabe von Losartan (30 µg/g im Trinkwasser für 24h) gehemmt wurde. Beide Genotypen zeigten einen Abfall der Aldosteronkonzentration unter niedrig-K⁺. Dagegen wiesen die *task3*^{-/-} Mäuse gegenüber den Wildtypmäusen unter hoch-K⁺ einen deutlich abgeschwächten Anstieg der Aldosteronkonzentration auf. Demnach scheint TASK3 einen Einfluss auf die Regulation der Aldosteronsekretion durch Kalium zu haben. *bedeutet statistisch signifikant verschieden zwischen Wildtyp und *task3*^{-/-}

4.2.2 Hyperaldosteronismus bei jungen *task3*^{-/-} Mäusen

Wie im Kapitel über den Phänotyp der *task1*^{-/-} Mäuse dargestellt wurde, zeigten *task1*^{-/-} Mäuse vor der Pubertät eine geschlechtsunabhängige Zonierungsstörung der Nebenniere, während bei den adulten Mäusen nur die weiblichen *task1*^{-/-} Mäuse betroffen waren. Dagegen konnte in den Nebennieren der adulten *task3*^{-/-} Mäuse keine Veränderung der Lokalisation der Aldosteronsynthese nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Außerdem bestand bei adulten *task3*^{-/-} Mäusen unter Kontrolldiät keine Störung der Aldosteronsekretion. Allerdings offenbarte die Untersuchung von jungen *task3*^{-/-} Mäusen vor der Pubertät Veränderungen im Aldosteronhaushalt, die im Folgenden beschrieben werden:

Junge *task3*^{-/-} Mäuse zeigten eine viel höhere Aldosteronkonzentration im Plasma als die Wildtypmäuse (Abb. 17). Dieser Unterschied war direkt nach der Geburt am größten und nahm dann innerhalb der ersten 2-3 Wochen ab. Ältere Mäuse (ab 21 Tagen) hatten

dagegen keine signifikant verschiedenen Werte für Aldosteron im Plasma (Normaldiät). Der Hyperaldosteronismus der jungen *task3*^{-/-} Mäusen führte bei 1-12 Tage alten Mäusen zu einer signifikanten höheren Na⁺ Konzentration im Plasma als bei Wildtypmäusen (WT: 140.3 ± 1.19 mM, n=22; *task3*^{-/-}: 144.5 ± 1.53 mM, n=16). Außerdem wurde ein signifikant kleinerer Hämatokrit in bis zu 12 Tage alten *task3*^{-/-} Mäusen als in den Kontrollen nachgewiesen (WT: 37.9 ± 1.1 %, n=32; *task3*^{-/-}: 34.6 ± 1.1 %, n=23). Vermutlich führte die hohe Aldosteronkonzentration bei den jungen *task3*^{-/-} Mäusen über eine verstärkten Na⁺ Rückresorption zu einer Volumenexpansion und dadurch zu einem niedrigeren Hämatokrit als in den Wildtypmäusen.

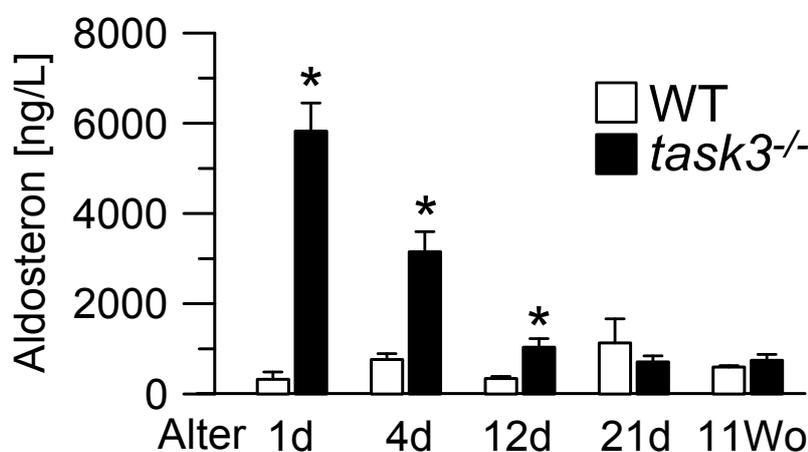


Abb. 17: Altersabhängigkeit von Plasma-Aldosteron in *task3*^{-/-} Mäusen

Dargestellt ist die Aldosteronkonzentration im Plasma von jungen Wildtypmäusen und *task3*^{-/-} Mäusen mit zunehmendem Alter (1, 4, 12, und 21 Tage nach der Geburt; im Vergleich dazu 11 Wochen alte adulte Mäuse). Direkt nach der Geburt hatten *task3*^{-/-} Mäuse deutlich höhere Aldosteronwerte als gleichaltrige Wildtypmäuse. Dieser Unterschied nahm altersabhängig ab und war bei 21 Tage alten Mäusen nicht mehr vorhanden. Die TASK3-Deletion verursacht demnach unabhängig vom Geschlecht bei jungen Mäusen einen Hyperaldosteronismus, der nach der Pubertät von den adulten *task3*^{-/-} Mäusen kompensiert werden kann. *bedeutet statistisch signifikant verschieden zwischen *task3*^{-/-} und Wildtyp

4.2.3 Expression und Lokalisation der Aldosteronsynthase in jungen *task3*^{-/-} Mäusen

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, inwieweit der beobachtete Hyperaldosteronismus der jungen *task3*^{-/-} Mäuse mit der Lokalisation und der Expressionshöhe der Aldosteronsynthase korrelierte. Dazu wurde die Aldosteronsynthase mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen in den Nebennieren von jungen *task3*^{-/-} Mäusen und Wildtypmäusen unterschiedlichen Alters (1, 7, 14 und 21 Tage alt) nachgewiesen (Abb. 18). Dabei zeigte sich, dass die Aldosteronsynthase sowohl in den Wildtypmäusen, als

auch in den *task3*^{-/-} Mäusen unabhängig vom Alter der Mäuse in der Zona glomerulosa exprimiert wurde. Der Hyperaldosteronismus der jungen *task3*^{-/-} Mäuse wird demnach – im Gegensatz zu den *task1*^{-/-} Mäusen – nicht durch eine Zonierungsstörung der Nebennieren verursacht.

Die Untersuchung der Expressionsstärke der Aldosteronsynthese mittels Realtime PCR und Western Blot ergab widersprüchliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Die mRNA Expression der Aldosteronsynthese war nur bei 12 Tage alten *task3*^{-/-} Mäusen signifikant größer als bei den Wildtypmäusen. Die Western Blot Analyse von Proteinlysaten aus Nebennieren von 4 und 12 Tage alten Mäusen ergab dagegen eine geringere Proteinexpression der Aldosteronsynthese in den *task3*^{-/-} Mäusen. Bei der Immunfluoreszenzfärbung zeigten beide Genotypen eine gleich große Expressionsstärke der Aldosteronsynthese. Zusammengenommen sprechen diese Daten nicht für eine Induktion der Expression der Aldosteronsynthese als Ursache des Hyperaldosteronismus der jungen *task3*^{-/-} Mäuse. Weitere Experimente sind nötig, um diese Befunde zu verifizieren.

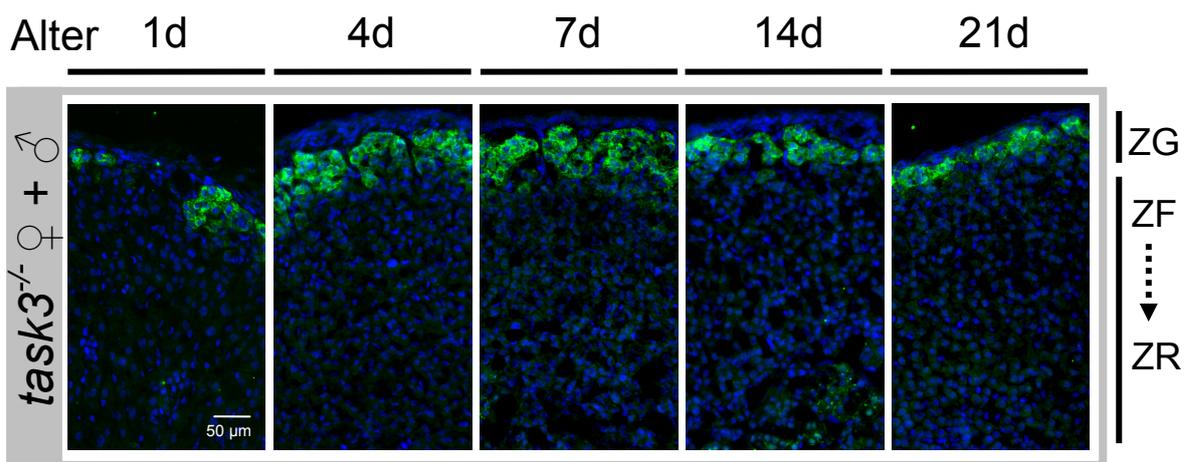


Abb. 18: Altersabhängige Lokalisation der Aldosteronsynthese in der Nebenniere (*task3*^{-/-})
 Immunfluoreszenzfärbungen der Aldosteronsynthese (grün; Kernfärbung mit HOE33342 in blau) in Nebennieren von jungen weiblichen und männlichen *task3*^{-/-} Mäusen unter Kontrolldiät. Die Tiere wurden jeweils am 1., 4., 7., 14. und 21. Tag nach der Geburt mit PFA fixiert. Die TASK3-Deletion hatte unabhängig vom Alter keinen Einfluss auf die Lokalisation der Aldosteronsynthese in der Zona glomerulosa (Zum Vergleich mit Wildtypmäusen siehe auch Abb. 13). Der Hyperaldosteronismus der jungen *task3*^{-/-} Mäuse wird demnach nicht durch eine Störung der Zonierung der Nebennierenrinde verursacht. ZG (Zona glomerulosa), ZF (Zona fasciculata), ZR (Zona reticularis)

5 Diskussion

Die Regulation der Aldosteronsekretion in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde durch Ang II und hohes Plasma K^+ hängt maßgeblich von einer hohen K^+ -Hintergrundleitfähigkeit dieser Zellen ab (siehe Einleitung). Welche Rolle die 2-P-Domänen-Kaliumkanäle (K2P) TASK1 und TASK3 in diesem System spielen, ist bisher nur teilweise aufgeklärt. In der hier vorgestellten Arbeit wurde untersucht, welche Konsequenzen die genetische Deletion von TASK1 bzw. TASK3 bei Mäusen für die Funktion der Nebenniere hat. Die erhobenen Daten unterstreichen die Bedeutung dieser K2P-Kaliumkanäle für die Regulation der Aldosteronsekretion. Mit dem Nachweis der von TASK1 determinierten Zonierung der Nebenniere konnte ein bisher in dieser Form unbekannter Aspekt der Funktion von Kaliumkanälen aufgedeckt werden.

5.1 Hyperaldosteronismus und Bluthochdruck der *task1*^{-/-} Mäuse

Weibliche *task1*^{-/-} Mäuse zeigten einen Hyperaldosteronismus, der von einer arteriellen Hypertension begleitet wurde. Die signifikant kleinere Herzfrequenz der weiblichen *task1*^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen schloss die Möglichkeit aus, dass eine Aktivierung des Sympathikus der Grund für die beobachtete Hypertension sein könnte. Eine durch den Sympathikus ausgelösten Blutdruckerhöhung (mit einer Wirkung des Sympathikus auf das Herz) würde eher von einer gesteigerten Herzfrequenz begleitet werden. Die Blockierung des Mineralokortikoidrezeptors mittels Canrenoat führte zu einer Normalisierung des hohen Blutdrucks der weiblichen *task1*^{-/-} Mäuse, während die Wildtypmäuse nicht beeinflusst wurden. Deshalb scheint eine durch den Hyperaldosteronismus induzierte Volumenexpansion der entscheidende Faktor für die Ausbildung des Bluthochdrucks in Abhängigkeit von der TASK1 Deletion zu sein. Entsprechend dazu konnte auch eine erhöhte Na^+ -Rückresorption infolge des Hyperaldosteronismus anhand von Ussing-Kammer Experimenten am distalen Kolon der weiblichen *task1*^{-/-} Mäuse beobachtet werden. Trotzdem wiesen weibliche *task1*^{-/-} Mäuse gegenüber den Wildtypmäusen keine erhöhte Konzentration von Na^+ im Plasma auf. Dieses Phänomen kennt man auch beim Menschen als sogenannten „Aldosteron-Escape“. Eine Rolle spielen hier wahrscheinlich die verstärkte Ausschüttung des Atrialen Natriuretischen Peptids (ANP), die reduzierte Expression des Thiazid-sensitiven Na^+Cl^- -Kotransporters sowie die Druckdiurese aufgrund der Hypertension (Hall, 1984; Granger,

1987; Wang, 2001). Durch diese kompensatorischen Mechanismen kommt es zu einer ausgeglichenen Na^+ -Bilanz trotz des Hyperaldosteronismus.

Unter physiologischen Bedingungen sind die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) und eine Hyperkaliämie die wichtigsten Stimuli der Aldosteronsekretion. Weibliche *task1*^{-/-} Mäuse wiesen eine geringere Plasma-Renin-Aktivität und eine geringere Plasma K^+ -Konzentration als die Wildtypmäuse auf, was klar für eine gestörte Regulation der Aldosteronsekretion in diesen Tieren spricht. Demnach lag bei den weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen ein primärer Hyperaldosteronismus vor. Die verminderte Reninaktivität in den weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen spricht für eine Hemmung der Reninsekretion durch den größeren renalen Perfusionsdrucks aufgrund des erhöhten Blutdrucks. Allerdings weiß man inzwischen, dass Renin und weitere Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems nicht nur in der Niere exprimiert werden, sondern auch in anderen Geweben, wie Gehirn, Herz und Nebenniere (Paul, 2006). Die Funktion dieses lokalen gewebeständigen RAS ist teilweise umstritten. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass eine Modulation der Reninexpression in den Nebennieren Anteil an der Entstehung des Hyperaldosteronismus der weiblichen *task1*^{-/-} Mäuse haben könnte.

Die Störung der Mineralokortikoidhomöostase war in adulten Mäusen auf das weibliche Geschlecht beschränkt. Adulte männliche *task1*^{-/-} Mäuse waren vollkommen normal hinsichtlich ihrer Aldosteronkonzentration im Plasma und konnten diese adäquat an verschiedene Salzdiäten anpassen. Offensichtlich ist der TASK1 Kanal in adulten männlichen Mäusen kein essentieller Faktor für die adrenokortikale Funktion, da sein Fehlen kompensiert werden kann.

5.2 TASK1 determiniert die Zonierung des adrenalen Kortex

Der klassische primäre Hyperaldosteronismus wird durch eine Hyperplasie der Nebenniere oder durch ein Aldosteron produzierendes Adenom verursacht (CONN, 1955; Carroll, 1996; Ganguly, 1998). Dies führte zu der Vermutung, dass der primäre Hyperaldosteronismus der weiblichen *task1*^{-/-} Mäuse mit ähnlichen histopathologischen Befunden einhergeht. Die Analyse der Morphologie von in Paraffin-eingebetteten Nebennieren von adulten Wildtypmäusen und *task1*^{-/-} Mäusen ergab keine Veränderungen, die typisch für Adenome sind (Daten nicht gezeigt). Dagegen deckte die Immunfluoreszenzfärbung der Aldosteronsynthase eine dramatische Veränderung in der funktionellen Zonierung der *task1*^{-/-} Nebennieren auf: Die Lokalisation der Aldosteron- produzierenden Zellen war von der subkapsulären Region (Zona glomerulosa) hin zum inneren Kortex (Zona fasciculata,

teilweise Zona reticularis) verschoben, wo sich typischerweise Zellen befinden, die Corticosteron produzieren. Trotzdem schien die Corticosteronsynthese in den *task1*^{-/-} Mäusen dadurch nicht beeinträchtigt zu sein, da weder die Konzentration von Corticosteron im Plasma, noch die Expression der 11 β -Hydroxylase (welche in Mäusen den letzten Schritt der Corticosteronsynthese katalysiert) durch die Deletion von TASK1 beeinflusst wurde. Bisher ist in der Literatur kein Fall bekannt, der so drastische Veränderungen in der Ausbildung der adrenokortikalen Zonierung zeigt.

Die adrenale Zonierung ist ein dynamischer Prozess, der von Alter, Geschlecht und Spezies abhängt (Tanaka, 1995; Parker, 1997; Wotus, 1998). Neben Steroidproduzierenden Enzymen, wurden erst wenige Marker identifiziert, die zonenspezifisch im adrenalen Kortex von Nagern exprimiert werden (Okamoto, 1997; Mitani, 1999; Romero, 2007). Dazu gehören die schon in der Einleitung erwähnten nukleären Rezeptoren der NR4 Familie (Nurr1, NGFI-B), die an der Aktivierung der Expression der Aldosteronsynthase und der 3 β -OH-Steroiddehydrogenase Typ II (HSD3B3) beteiligt sind (Bassett, 2004; Lu, 2004). Der exakte molekulare Mechanismus zur Kontrolle der adrenokortikalen Zonierung ist dennoch weitgehend unbekannt. Die *task1*^{-/-} Maus mit ihrem „Alles oder Nichts“-Prinzip hinsichtlich der Zonierung scheint ein vielversprechendes Modell zu sein, um diesen Mechanismen auf die Spur zu kommen.

5.3 Dynamik der adrenokortikalen Zonierung

Geschlechtsspezifische Unterschiede einer physiologischen Funktion sprechen meistens dafür, dass Geschlechtshormone an dem jeweiligen Prozess beteiligt sind. Deshalb wurden die Histologie und das Zonierungsmuster von Nebennieren junger Mäuse untersucht, die noch nicht das Alter der Pubertät erreicht hatten. Diese Experimente offenbarten eine unerwartete Plastizität der Nebennierenrinde. Direkt nach der Geburt waren die *task1*^{-/-} Mäuse, wie auch die Wildtypmäuse, unabhängig vom Geschlecht normal zoniert (Aldosteronsynthase in der Zona glomerulosa). Innerhalb der 1. Lebenswoche traten bei den *task1*^{-/-} Mäusen Veränderungen der Zonierung auf, von denen sowohl weibliche, als auch männliche *task1*^{-/-} Mäuse betroffen waren. Die vor Erreichen der Pubertät untersuchten Wildtypmäuse wiesen ein normales Zonierungsmuster auf, während bei *task1*^{-/-} Mäusen (ab 4-7 Tagen), unabhängig vom Geschlecht, die Expression der Aldosteronsynthase in der Zona glomerulosa fehlte und dafür in tieferen adrenokortikalen Schichten (Zona fasciculata bis Zona reticularis) auftauchte. Bei männlichen *task1*^{-/-} Mäusen bildete sich diese Störung nach der Pubertät wieder zurück, während sie bei

adulten weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen bestehen blieb. Vorläufige Untersuchungen (nicht gezeigt) legen nahe, dass es bei sehr alten weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen (> 8 Monate) möglicherweise ebenfalls zu einer Rückbildung der Zonierungsstörung kommen kann.

Um die Bedeutung der männlichen Geschlechtshormone für die Wiederherstellung der Zonierung zu untersuchen, wurden männliche Mäuse vor Vollendung der Pubertät kastriert und zusätzlich mit Östrogen behandelt. In männlichen Wildtypmäusen hatte die Kastration keinen Einfluss auf die Zonierung. Dagegen verhinderte die Kastration in den *task1*^{-/-} Mäusen die Ausbildung der normalen Zonierung nach der Pubertät. Demnach scheinen die Androgene ein kritischer Faktor für den Kompensationsmechanismus der männlichen *task1*^{-/-} Mäuse zu sein. Die mögliche Funktion der Androgene für die Kompensation der TASK1 Deletion wird durch den Befund bekräftigt, dass weibliche *task1*^{-/-} Mäuse nach Behandlung mit Testosteron eine normale Verteilung der Aldosteronsynthese in der Nebennierenrinde aufwiesen.

Diese zeit- und geschlechtsabhängige Dynamik der Zonierung in den Nebennieren von *task1*^{-/-} Mäusen lässt vermuten, dass hier ein Zusammenhang mit der in der Literatur beschriebenen Zone-X bestehen könnte (Howard-Miller, 1928; Holmes, 1971; Hershkovitz, 2007). Diese Zone-X stellt sich als histologisch abgrenzbare Struktur zwischen Kortex und Medulla dar, die erst nach der Geburt nachweisbar ist und bei männlichen Mäusen nach der Pubertät sowie bei weiblichen Mäusen während der ersten Schwangerschaft (und durch Behandlung mit Testosteron) wieder verschwindet (Holmes, 1971). Eine Kastration verhindert das Verschwinden der Zone-X in männlichen Mäusen, was vielleicht eine Erklärung für die Dezonierung der kastrierten männlichen *task1*^{-/-} Mäuse sein könnte. Kürzlich konnte das Enzym 20-alpha-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (20 α HSD) als spezifischer Marker von Zellen der Zone-X nachgewiesen werden (Hershkovitz, 2007). Die Expression und Lokalisation von 20 α HSD korrelierte dabei zeitlich mit dem Auftreten und der Regression der Zone-X. Es wäre interessant, zu überprüfen, wie sich die Expression von 20 α HSD in der Nebenniere während der Entwicklung der *task1*^{-/-} Mäuse verhält. Allerdings gibt es auch Hinweise, die gegen eine mögliche Involvierung der Zone-X bei der Ausprägung des adrenalen Phänotyps der *task1*^{-/-} Mäuse sprechen. So konnte bisher in der Zone-X keine 3 β -HSD-Aktivität nachgewiesen werden, so dass dort die Vorstufen für die Aldosteronsynthese fehlen (Hershkovitz, 2007). Während Dexamethason den Hyperaldosteronismus der weiblichen *task1*^{-/-} Mäuse supprimierte, scheint Dexamethason keinen Einfluss auf die Ausbildung der Zone-X zu haben (Hershkovitz, 2007).

Weitere Experimente sind notwendig, um den Mechanismus der dynamischen Zonierung der Nebennieren von *task1*^{-/-} Mäusen aufzuklären. Wie kommt es zur Abschaltung der Expression der Aldosteronsynthase in den Glomerulosazellen der dezontierten *task1*^{-/-} Mäuse? Wodurch wird die Expression der Aldosteronsynthase in tieferen Schichten des adrenalen Kortex stimuliert? Eine Hypothese ist, dass TASK1 normalerweise die Expression der Aldosteronsynthase in der Zona fasciculata hemmt. Die Deletion von TASK1 würde dann nach Wegfall dieser Hemmung zu dem beobachteten Hyperaldosteronismus führen. Als Reaktion auf die zu hohe Aldosteronkonzentration im Plasma könnte es dann durch Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems zu einer dauerhaften Supprimierung der Expression der Aldosteronsynthase in der Zona glomerulosa kommen. In diesem Zusammenhang sollte noch überprüft werden, ob die Behandlung der weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen mit Dexamethason nicht nur zu einer Aufhebung des Hyperaldosteronismus führt, sondern vielleicht auch einen Einfluss auf die Zonierung hat. Möglicherweise führt die Deletion von TASK1 aber auch zu einer Migration von Zellen aus der Zona glomerulosa oder es findet eine glomerulosa-ähnliche Differenzierung aus Stammzellen innerhalb der Zona fasciculata statt (Abb. 19). Die Tatsache, dass die reguläre Zonierung und Funktion des adrenalen Kortex unter der strikten Kontrolle der Expression eines K⁺-Kanals steht, ist sicherlich ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit. Die Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus wird nicht nur zu einem besseren Verständnis der Nebennierenphysiologie beitragen, sondern auch Hinweise für weitere Fragestellungen liefern, bei denen K⁺-Kanäle eine Rolle spielen.

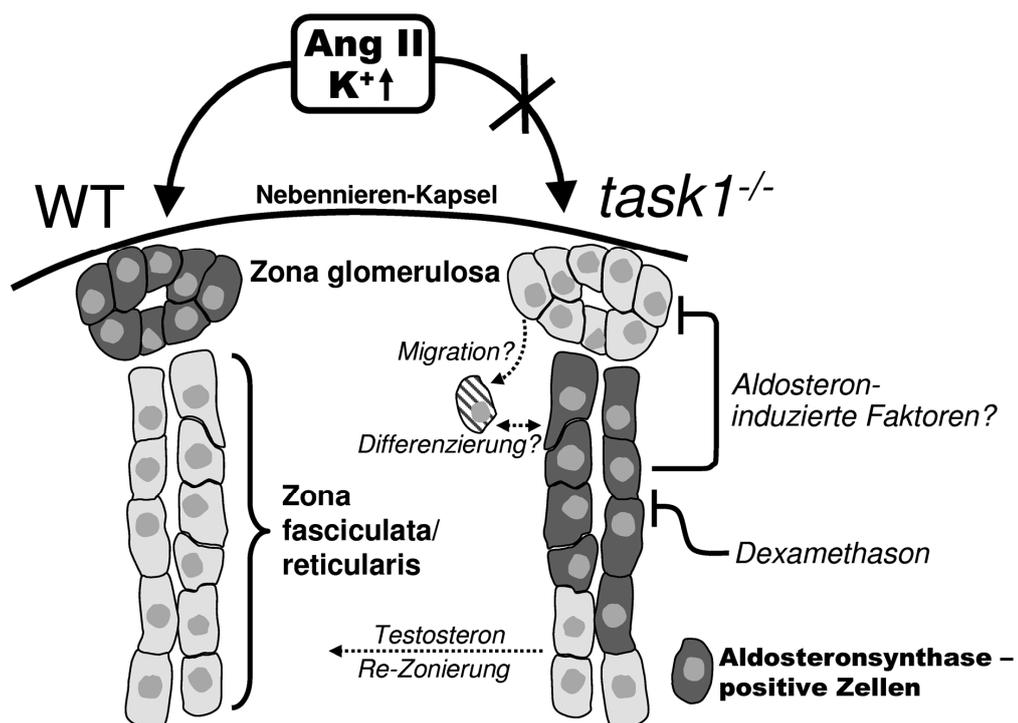


Abb. 19 (↑): Modell zur dynamischen Zonierung der Nebenniere bei *task1*^{-/-} Mäusen

Die Ursache des geschlechtsabhängigen primären Hyperaldosteronismus bei *task1*^{-/-} Mäusen ist eine Zonierungsstörung der Nebennierenrinde mit fehlender Expression der Aldosteronsynthese in der Zona glomerulosa (ZG) und abnormaler Expression in der Zona fasciculata (ZF) und zum Teil auch in der Zona reticularis (ZR). Die Expression der Aldosteronsynthese in der ZF bei *task1*^{-/-} Mäusen steht unter der Kontrolle von ACTH: Suppression von Plasma-ACTH durch das Glukokortikoid Dexamethason hebt den Hyperaldosteronismus auf. Testosteron führt zu einer Kompensation der TASK1-Deletion und zur Re-Zonierung. *Hypothese*: Die TASK1-Deletion induziert die abnormale Expression der Aldosteronsynthese in der ZF. Das erhöhte Plasma-Aldosteron hemmt direkt oder indirekt die Expression der Aldosteronsynthese in der ZG. Möglicherweise kommt es auch zu einer Zellmigration aus der ZG oder einer Zelldifferenzierung innerhalb der ZF. Testosteron verhindert über die Aktivierung anderer K⁺-Kanäle (z.B. TASK3) die Expression der Aldosteronsynthese in der ZF und ermöglicht dadurch eine normale Zonierung.

5.4 Bedeutung von TASK1 und TASK3 für die Regulation der Aldosteronsekretion

Wie in der Einleitung dargelegt wurde, bilden K2P-Kanäle als Dimere einen funktionellen Kaliumkanal aus. TASK1 und TASK3 kommen sowohl als Homodimere (Karschin, 2001), als auch in Form von heterodimeren TASK1/TASK3-Kaliumkanälen vor (Czirjak, 2002a). Möglicherweise kompensiert die TASK3 Expression ein Fehlen des TASK1 Kanals in den adulten männlichen *task1*^{-/-} Mäusen. Interessanterweise berichten alle bisher veröffentlichten Studien von einem eher milden Phänotyp der *task1*^{-/-} Mäuse. So wurde ein Fehlen ernsthafter neurologischer Symptome in *task1*^{-/-} Mäusen auf eine Kompensation durch Koexpression von TASK3 in diesen Neuronen zurückgeführt. Allerdings konnten wir erste Befunde, wonach adulte männliche Mäuse eine höhere adrenale TASK3-Expression aufwiesen als die Weibchen in weiteren Experimenten nicht bestätigen. Möglicherweise wird die Größe der Kaliumleitfähigkeit von TASK1/TASK3- Heterodimeren überwiegend durch TASK3 bestimmt, während TASK1 lediglich eine Funktion als modulatorische Untereinheit des Komplexes ausübt (Han, 2002; Kang, 2004; Aller, 2005; Linden, 2006; Meuth, 2006). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere K2P-Kaliumkanäle die Funktion von TASK1 in einem heteromeren Komplex mit TASK3 übernehmen können.

Zur Untersuchung der Kompensationsmechanismen bei adulten männlichen *task1*^{-/-} Mäusen führten wir Patch-clamp-Experimente mit primär kultivierten adrenokortikalen Zellen durch. Die Nebennierenzellen der *task1*^{-/-} Mäuse waren im Vergleich zu den Zellen der Wildtypmäuse unter Kontrollbedingungen stärker depolarisiert. Ein saurer extrazellulärer pH-Wert hatte keinen signifikanten Effekt auf die Ganzzellleitfähigkeit der *task1*^{-/-} Zellen, während in den untersuchten Zellen der Wildtypmäuse eine Hemmung dieser Leitfähigkeit beobachtet wurde. Trotzdem induzierte der saure pH-Wert eine signifikante Depolarisation der *task1*^{-/-} Zellen, womöglich weil auch sehr kleine Änderungen der Leitfähigkeit (z.B. durch Hemmung homodimerer TASK3-Kanäle) das Membranpotential beeinflussen.

Die pH-Empfindlichkeit von homodimeren TASK3-Kanälen ist gegenüber TASK1-Homodimeren oder TASK1/TASK3-Heterodimeren zu niedrigeren pH-Werten verschoben (Czirjak, 2002a), was vielleicht der Grund für den kleineren pH-Effekt in den *task1*^{-/-} Zellen war. In beiden Genotypen kam es durch Stimulation mit Ang II zu einer stärkeren Hemmung des Ganzzellstroms als durch den sauren pH-Wert. Ein größerer Effekt durch Ang II als durch sauren pH-Wert wurde auch schon in Glomerulosazellen aus Ratten gefunden (Czirjak, 2000). Demnach hemmt Ang II möglicherweise nicht nur TASK-ähnliche Kanäle, sondern weitere Kanäle, die unempfindlich gegenüber extrazellulärer Azidifizierung sind. Es ist bekannt, dass Ang II auch die Na⁺/K⁺ ATPase hemmt (Hajnoczky, 1992) und so zur Membrandepolarisation beitragen kann. Des Weiteren trägt der durch Ang II stimulierte Ca²⁺ Einstrom in die Zelle auch zur Membrandepolarisation bei.

Nach der Veröffentlichung unserer Daten erschien eine Arbeit über die *task1*^{-/-} / *task3*^{-/-} Maus (Doppelknockout), die weitere Informationen zur Rolle von TASK3 bei einem möglichen Kompensationsmechanismus der adulten männlichen *task1*^{-/-} Mäuse liefert (Davies, 2008). Während die adulten männlichen *task1*^{-/-} Mäuse in unseren Untersuchungen noch eine durch sauren pH-Wert induzierte Depolarisation zeigten, fehlte dieser Effekt in den *task1*^{-/-} / *task3*^{-/-} Mäusen vollständig. Die von Davies untersuchten adulten männlichen *task1*^{-/-} / *task3*^{-/-} Mäuse zeigten einen Renin-unabhängigen primären Hyperaldosteronismus. Im Gegensatz zu den von uns untersuchten adulten weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen waren sie aber teilweise in der Lage, ihre Aldosteronproduktion an verschiedene Na⁺-Diäten anzupassen. Dennoch wiesen sie stets eine höhere Aldosteronkonzentration als die Kontrolltiere auf und zeigten insbesondere unter einer Na⁺-reichen Diät keine Supprimierung der Aldosteronproduktion. Des Weiteren fanden die Autoren in den Nebennieren der *task1*^{-/-} / *task3*^{-/-} Mäuse eine normale Lokalisation der Aldosteronsynthase (CYP11B2) in der Zona glomerulosa und der 11-β-Hydroxylase (CYP11B1) in der Zona fasciculata und Zona reticularis. Anhand dieser Daten kann man nun schlussfolgern, dass TASK3 zumindest teilweise an einem Kompensationsmechanismus der adulten männlichen *task1*^{-/-} Mäuse beteiligt ist, da die zusätzliche Deletion von TASK3 zu dem beschriebenen Hyperaldosteronismus führt. Die normale Zonierung der Nebenniere von *task1*^{-/-} / *task3*^{-/-} Mäusen zeigt aber, dass neben TASK3 zusätzliche geschlechtsabhängige kompensatorische Faktoren vorhanden sein müssen. Denkbar ist, dass neben den beschriebenen TASK1/TASK3-Dimeren weitere heteromere Komplexe aus K2P-Kanälen existieren und an der Regulation der Aldosteronsekretion beteiligt sind. In bovinen

Glomerulosazellen scheint der K²P-Kanal TREK-1 wesentlichen Einfluss auf das Membranpotential und die Regulation der Aldosteronsekretion zu haben (Enyeart, 2004). Inwieweit TREK-1 an der Ausbildung der normalen adrenalen Zonierung beteiligt ist, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden.

5.5 Regulation der Aldosteronsekretion bei adulten *task3*^{-/-} Mäusen

Um die Rolle von TASK3 für die Regulation der Aldosteronsekretion eingehender zu klären, wurden auch *task3*^{-/-} Mäuse von uns untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Aldosteronstoffwechsel bei adulten *task3*^{-/-} Mäusen unabhängig vom Geschlecht weitgehend normal war. Lediglich unter einer K⁺-reichen Diät reagierten die *task3*^{-/-} Mäuse mit einem kleineren Anstieg der Aldosteronkonzentration im Plasma als die Wildtypmäuse. Bei einer Na⁺-reichen bzw. Na⁺-armen Diät verhielten sich Wildtypmäuse und *task3*^{-/-} Mäuse dagegen ähnlich und reagierten beide mit einem Abfall der Aldosteronkonzentration nach Gabe des AT₁-Rezeptor-Blockers Candesartan unter der Na⁺-armen Diät. Der spezifische Unterschied in der Reaktion auf die Änderung der Kaliumkonzentration im Plasma durch die K⁺-reiche Diät und auf die Änderung der Ang II Konzentration durch die verschiedenen Na⁺-Diäten liegt vielleicht an der unterschiedlichen Empfindlichkeit von TASK1 und TASK3 gegenüber Hemmung durch Ang II. Eine Arbeitsgruppe (Czirjak, 2002a) fand nach Überexpression des jeweiligen Kanals in Oozyten für TASK1 eine Hemmung des Stroms durch Ang II um 75%, für TASK3 dagegen nur um 20%. Möglicherweise hängt die durch Ang II ausgelöste Membrandepolarisation und nachfolgende Aldosteronsekretion im Wesentlichen von TASK1 ab, so dass ein Fehlen von TASK3 in den *task3*^{-/-} Mäusen darauf keine Auswirkungen hat. Da die elektrischen Kanaleigenschaften von TASK1/TASK3-Heterodimeren denen von TASK3-Homodimeren entsprechen (Kang, 2004), trägt TASK3 vielleicht in stärkerem Maße zur Ausbildung der K⁺-Hintergrundleitfähigkeit bei. In diesem Fall würde sich ein Fehlen von TASK3 eher auf die vom Plasma K⁺ abhängige Membrandepolarisation und Aldosteronsekretion auswirken, als eine Deletion des TASK1-Kanals.

5.6 Hyperaldosteronismus in jungen *task3*^{-/-} Mäusen

Bei der Untersuchung von *task1*^{-/-} Mäusen vor der Pubertät fanden wir geschlechtsunabhängige Defekte der Nebennierenzonierung. Dementsprechend wurde auch die Nebennierenfunktion von *task3*^{-/-} Mäusen vor Erreichen der Pubertät analysiert.

Dabei konnte ein deutlicher Hyperaldosteronismus der jungen *task3*^{-/-} Mäuse beobachtet werden. Der Unterschied in der Aldosteronkonzentration im Plasma von Wildtypmäusen und *task3*^{-/-} Mäusen war am ersten Tag nach der Geburt am größten, nahm dann ab (noch signifikant am 12. postnatalen Tag) und war bei 21 Tage alten Mäusen schließlich nicht mehr vorhanden. Immunfluoreszenzfärbungen der Nebennieren ergaben, dass die jungen *task3*^{-/-} Mäuse trotz des Hyperaldosteronismus - und im Gegensatz zu den *task1*^{-/-} Mäusen - keinen adrenokortikalen Zonierungsdefekt aufwiesen.

Die unterschiedlichen Effekte der Deletion von TASK1 bzw. TASK3 auf die Zonierung der Nebenniere werden vielleicht durch die abweichende Lokalisation beider Kanäle bestimmt. Wie in unserem Labor mittels *in-situ-Hybridisierung* nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt), wird TASK3 spezifisch in der Zona glomerulosa exprimiert, während TASK1 sowohl in der Zona glomerulosa, als auch in der Zona fasciculata vorkommt. Der Hyperaldosteronismus der jungen *task3*^{-/-} Mäuse scheint nicht von einer erhöhten adrenalen Expression der Aldosteronsynthese abzuhängen, wie Experimente mittels Western Blot und Realtime PCR nahelegen. Der beobachtete Hyperaldosteronismus führt allerdings bei bis zu 12 Tage alten Mäusen zu einer erhöhten Konzentration von Na⁺ im Plasma und zu einem kleineren Hämatokrit als bei den Wildtypmäusen. Möglicherweise ist die erhöhte Aldosteronkonzentration bei jungen *task3*^{-/-} Mäusen extraadrenalem Ursprungs. In der Literatur wurden neben der Nebenniere als Syntheseort von Aldosteron auch Herz (Rudolph, 2000; Yoshimura, 2002) und Gehirn diskutiert (Ozaki, 1991; Gomez-Sanchez, 1997; MacKenzie, 2000). MacKenzie konnte eine spezifische Expression der Aldosteronsynthese in Purkinje-Zellen des Cerebellums von Ratten nachweisen. Interessanterweise fand eine andere Arbeitsgruppe (Rusznak, 2004) in Purkinje-Zellen von Ratten und Menschen auch eine Expression von TASK3. In einer weiteren Arbeit (Brickley, 2001) wurde die altersabhängige Expression von TASK3 und TASK1 im Cerebellum der Maus untersucht. Dabei zeigte sich eine sehr geringe TASK1-Expression bei bis zu 7 Tage alten Mäusen, die bei 14 Tage alten Mäusen deutlich zugenommen hatte und bei adulten Mäusen ihr Maximum erreichte. Dagegen war die Expression von TASK3 schon bei 7 Tage alten Mäusen deutlich vorhanden, erreichte ihr Maximum bei 14 Tage alten Mäusen, um dann wieder abzufallen. Falls ein Zusammenhang zwischen der Aldosteronsynthese und der TASK3-Expression im Cerebellum besteht, würde sich ein Fehlen von TASK3 in den *task3*^{-/-} Mäusen am ehesten innerhalb der ersten 2 Wochen nach der Geburt auswirken. Weitere Experimente werden

zeigen, ob die hohe Aldosteronkonzentration der jungen *task3*^{-/-} Mäuse ihren Ursprung im Cerebellum hat und welche Rolle die TASK-Kanäle in diesem Geschehen spielen.

Die Möglichkeit, dass die hohe Aldosteronkonzentration im Plasma der *task3*^{-/-} Mäuse aus den Muttertieren stammt, kann wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Es konnte zwar an Ratten beobachtet werden, dass die Aldosteronkonzentration während der Schwangerschaft deutlich ansteigt (Brochu, 1997). Allerdings beträgt die Halbwertszeit von Aldosteron im Blut nur 15 min (Henriksen, 1991), so dass ein Hyperaldosteronismus der Muttertiere während der Schwangerschaft nicht die Ursache für die erhöhten Aldosteronwerte der jungen *task3*^{-/-} Mäuse sein kann. Allerdings ist nicht sicher, ob die Aldosterondegradation in jungen Mäusen ähnlich effizient verläuft wie in den adulten Mäusen.

Vielleicht ist die Expression der Aldosteronsynthese in den jungen *task3*^{-/-} Mäusen nicht limitierend für die Rate der Aldosteronsynthese. Beim Menschen kennt man Mutationen der Aldosteronsynthese, die zu einer deutlichen Reduzierung des letzten Schritts der CYP11B2-Reaktion (18-Hydroxycorticosteron zu Aldosteron) führen. Trotzdem weisen die Träger der Mutation normale Aldosteronwerte auf (White, 1994). Vielleicht kommt es in diesen Patienten kompensatorisch zu einer Überexpression von Enzymen, die in der Reaktionskette der Aldosteronsynthese vor CYP11B2 stehen (z.B. StAR oder CYP21). Das vermehrte Substratangebot könnte so die verminderte Aktivität der Aldosteronsynthese ausgleichen. In einem analogen Mechanismus kommt es vielleicht in den jungen *task3*^{-/-} Mäusen bei gleicher CYP11B2 Expression zu einer erhöhten Aldosteronsekretion. In weiteren Experimenten sollte deshalb auch die Expression anderer Enzyme der Aldosteronsynthesekette untersucht werden. Möglicherweise gibt es auch regulatorische Faktoren, die *in vivo* die Enzymaktivität der Aldosteronsynthese beeinflussen und so in den jungen *task3*^{-/-} Mäusen bei gleichem Expressionslevel der Aldosteronsynthese eine höhere Aldosteronkonzentration im Plasma zur Folge haben würden. Als Mechanismen, die zur Regulation der Enzymaktivität der Aldosteronsynthese beitragen könnten, wurden bisher unter anderem die Phosphorylierung der Aldosteronsynthese als post-translationelle Modifizierung (Bureik, 2002), Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der Mitochondrienmembran (Ohnishi, 1984), sowie die Modulation der Übertragungseffizienz der Elektronen innerhalb des NADPH-abhängigen Redoxsystems (Cao and Bernhardt, 1999) in der Literatur diskutiert. Der Mechanismus für die Entstehung des Hyperaldosteronismus der jungen *task3*^{-/-} Mäuse ist zwar noch unklar, möglicherweise kann man aber hierzu Anhaltspunkte finden, wenn man versteht, wie es zu der Kompensation dieses Hyperaldosteronismus in den adulten *task3*^{-/-} Mäusen kommt.

5.7 Klinische Relevanz der Befunde

Die Inaktivierung von TASK1 führt zu ungewöhnlich hohen Aldosteronkonzentrationen im Plasma und verursacht dadurch Na^+ -Retention und Wasserretention, was letztendlich Bluthochdruck zur Folge hat. Dieser Hyperaldosteronismus ist mit einer niedrigen Reninaktivität im Plasma assoziiert und wird vollständig durch Behandlung mit Glukokortikoiden (Dexamethason) aufgehoben. Beim Menschen kennt man ebenfalls einen durch Glukokortikoide supprimierbaren Hyperaldosteronismus, der durch eine fehlerhafte Genrekombination (crossover) zustande kommt. Dabei entsteht ein chimäres Gen aus 11 β -Hydroxylase und Aldosteronsynthase, das in der Zona fasciculata exprimiert wird und unter der Kontrolle von ACTH steht (Lifton, 1992; Pascoe, 1995). Die Folge ist eine Aldosteronsekretion, die unabhängig von Ang II und Plasma K^+ ist, aber durch Glukokortikoid-induzierte ACTH-Suppression gehemmt werden kann. Allerdings wurden auch Patienten mit einer Form des primären Hyperaldosteronismus beschrieben, die nicht dieses chimäre Gen trugen und deren Aldosteronwerte trotzdem durch Glukokortikoidbehandlung normalisiert werden konnten (Gordon, 1995; Mulatero, 1998; Fardella, 2001). Die molekulare Ursache ist bei diesen Patienten noch unbekannt. TASK1 wird in der Nebenniere des Menschen exprimiert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.645288>). Wir konnten die Expression von TASK1 in humanen Nebennieren mittels ISH bestätigen (unveröffentlichte Daten). Möglicherweise können Veränderungen in der Expression oder Funktion von TASK1 auch beim Menschen zu einem primären Hyperaldosteronismus führen, der durch Glukokortikoide supprimierbar ist. Die bisherigen Befunde zu den *task3*^{-/-} Mäusen zeigen, dass auch TASK3 an der Aufrechterhaltung der Aldosteronhomöostase beteiligt ist. Zwar zeigten nur junge *task3*^{-/-} Mäuse einen Hyperaldosteronismus, während die adulten Mäuse die TASK3-Deletion weitgehend kompensieren konnten. Allerdings sind Erkrankungen in ihrer Entstehung oftmals multifaktoriell bedingt. Demnach könnte eine Veränderung in der Expression oder Funktion von TASK3 im Menschen gegebenenfalls eine Störung des Mineralokortikoidhaushalts verstärken.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Konsequenzen die genetische Deletion der 2-P-Domänen-Kaliumkanäle TASK1 bzw. TASK3 für Regulation der Aldosteronsekretion in der Nebenniere der Maus hat.

Das Mineralokortikoid Aldosteron wird in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde gebildet und hat großen Einfluss auf den Wasser- und Elektrolythaushalt. Störungen der Mineralokortikoid-Homöostase können zu krankhaften Veränderungen wie Bluthochdruck führen. Die Stimulation der Aldosteronsekretion durch Angiotensin II (Ang II) und hohes Plasma K^+ hängt von einer hohen K^+ -Hintergrundleitfähigkeit der Glomerulosazellen ab. Bisherige Daten aus der Literatur sprachen dafür, dass TASK1 und TASK3 durch Ang II gehemmt werden und maßgeblich das Membranpotential der Glomerulosazellen bestimmen. Während dieser Hypothese Zellkultur-Experimente zugrunde lagen, bot die Untersuchung der *Knockout*-Mäuse die Möglichkeit, die Bedeutung dieser K^+ -Kanäle für die Funktion der Nebenniere auch *in vivo* aufzuklären.

Adulte *task1*^{-/-} Mäuse wiesen einen ausgeprägten Hyperaldosteronismus auf, der auf das weibliche Geschlecht beschränkt war und nicht durch physiologische Regulatoren der Aldosteronsekretion, die über verschiedene Salzdiäten stimuliert wurden, beeinflusst werden konnte. Dieser primäre (Renin-unabhängige) Hyperaldosteronismus führte zu einer Hypertension und einer verstärkten Aktivierung des epithelialen Na^+ -Kanals (ENaC). Die Normalisierung des Blutdrucks durch Behandlung mit dem Mineralokortikoidrezeptor-Blocker Canrenoat spricht für eine erhöhte Na^+ -Reabsorption mit nachfolgender Volumenexpansion als Ursache dieser Hypertension.

Immunfluoreszenzfärbungen mit Hilfe eines Antikörpers gegen die Aldosteronsynthase zeigten einen geschlechtsabhängigen Einfluss der TASK1-Deletion auf die Lokalisation der Aldosteronsynthase innerhalb der Nebennierenrinde: Während Wildtypmäuse und adulte männliche *task1*^{-/-} Mäuse eine normale Zonierung der Nebenniere mit Expression der Aldosteronsynthase in der Zona glomerulosa aufwiesen, fehlte bei weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen die Aldosteronsynthase in der Zona glomerulosa und wurde stattdessen in tieferen kortikalen Zellschichten (überwiegend Zona fasciculata) exprimiert. Demnach scheint die Ursache für den primären Hyperaldosteronismus der weiblichen *task1*^{-/-} Mäuse in der gestörten Zonierung der Nebenniere und dem gleichzeitigen Verlust der normalen Regulation der Aldosteronsekretion zu liegen. Weitere Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung der Geschlechtshormone: Die Dezonierung der Nebenniere bestand bei *task1*^{-/-}

Mäusen vor der Pubertät geschlechtsunabhängig. Kastrierte männliche *task1*^{-/-} Mäuse waren nicht mehr in der Lage, eine normale Zonierung auszubilden. Eine Testosteronbehandlung führte bei weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen zur Aufhebung der Dezonierung. Elektrophysiologische Untersuchungen an primär kultivierten adrenokortikalen Zellen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik sprechen dafür, dass andere K⁺-Kanäle (z.B. TASK3 oder TREK1) die TASK1-Deletion bei adulten männlichen Mäusen kompensieren.

Beim Menschen kennt man eine Form des primären Hyperaldosteronismus, bei der die Aldosteronkonzentration im Plasma durch Therapie mit Glukokortikoiden gesenkt werden kann. Interessanterweise führte die Behandlung mit dem Glukokortikoid Dexamethason, welches im Sinne einer negativen Rückkopplung die Ausschüttung von ACTH aus der Hypophyse hemmt, zu einer vollständigen Aufhebung des Hyperaldosteronismus bei adulten weiblichen *task1*^{-/-} Mäusen.

Die Untersuchung der *task3*^{-/-} Mäuse zeigte, dass TASK3 ebenfalls an der Ausbildung einer normalen Nebennierenfunktion beteiligt ist: Bei adulten Mäusen verursachte die TASK3-Deletion eine abgeschwächte Stimulierbarkeit der Aldosteronsekretion durch hohes Plasma K⁺. Junge *task3*^{-/-} Mäusen wiesen einen geschlechtsunabhängigen Hyperaldosteronismus auf, der - im Gegensatz zu den *task1*^{-/-} Mäusen - nicht durch eine Zonierungsstörung der Nebenniere verursacht wurde.

Die erhobenen Daten unterstreichen die Bedeutung von TASK1 und TASK3 für die Regulation der Aldosteronsekretion. Mit dem Nachweis der von TASK1 determinierten Zonierung der Nebenniere konnte eine bisher in dieser Form unbekannt Funktion von Kaliumkanälen aufgedeckt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen außerdem auf eine mögliche Beteiligung von TASK1 und TASK3 an der Entstehung krankhafter Veränderungen des Mineralokortikoidhaushalts beim Menschen hin.

7 Literaturverzeichnis

1. Aller,M.I., Veale,E.L., Linden,A.M., Sandu,C., Schwaninger,M., Evans,L.J., Korpi,E.R., Mathie,A., Wisden,W., and Brickley,S.G. (2005). Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.*, **25**, 11455-11467.
2. Arrighi,I., Bloch-Faure,M., Grahammer,F., Bleich,M., Warth,R., Mengual,R., Drici,M.D., Barhanin,J., and Meneton,P. (2001). Altered potassium balance and aldosterone secretion in a mouse model of human congenital long QT syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 8792-8797.
3. Barrett,P.Q., Lu,H.K., Colbran,R., Czernik,A., and Pancrazio,J.J. (2000). Stimulation of unitary T-type Ca(2+) channel currents by calmodulin-dependent protein kinase II. *Am. J. Physiol Cell Physiol*, **279**, C1694-C1703.
4. Bassett,M.H., White,P.C., and Rainey,W.E. (2004). The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol. Cell Endocrinol.*, **217**, 67-74.
5. Bielohuby M, Herbac N, Wanke R, Maser-Gluth C, Beuschlein F, Wolf E, and Hoeflich A. (2007). Growth analysis of the mouse adrenal gland from weaning to adulthood: time- and gender-dependent alterations of cell size and number in the cortical compartment. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab*, **293**, E139-E146.
6. Boon,W.C., Roche,P.J., Butkus,A., McDougall,J.G., Jeyaseelan,K., and Coghlan,J.P. (1997). Functional and expression analysis of ovine steroid 11 beta-hydroxylase (cytochrome P450 11 beta). *Endocr. Res.*, **23**, 325-347.
7. Brandenburger,Y., Kennedy,E.D., Python,C.P., Rossier,M.F., Vallotton,M.B., Wollheim,C.B., and Capponi,A.M. (1996). Possible role for mitochondrial calcium in angiotensin II- and potassium-stimulated steroidogenesis in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology*, **137**, 5544-5551.
8. Brickley,S.G., Aller,M.I., Sandu,C., Veale,E.L., Alder,F.G., Sambhi,H., Mathie,A., and Wisden,W. (2007). TASK-3 two-pore domain potassium channels enable sustained high-frequency firing in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.*, **27**, 9329-9340.
9. Brickley,S.G., Revilla,V., Cull-Candy,S.G., Wisden,W., and Farrant,M. (2001). Adaptive regulation of neuronal excitability by a voltage-independent potassium conductance. *Nature*, **409**, 88-92.
10. Brochu,M., LeHoux,J.G., and Picard,S. (1997). Effects of gestation on enzymes controlling aldosterone synthesis in the rat adrenal. *Endocrinology*, **138**, 2354-2358.

11. Bureik,M., Zeeh,A., and Bernhardt,R. (2002). Modulation of steroid hydroxylase activity in stably transfected V79MZh11B1 and V79MZh11B2 cells by PKC and PKD inhibitors. *Endocr. Res.*, **28**, 351-355.
12. Calhoun,D.A. (2007). Is there an unrecognized epidemic of primary aldosteronism? *Pro. Hypertension*, **50**, 447-453.
13. Cao,P.R. and Bernhardt,R. (1999). Modulation of aldosterone biosynthesis by adrenodoxin mutants with different electron transport efficiencies. *Eur. J. Biochem.*, **265**, 152-159.
14. Carroll,J., Dluhy,R., Fallo,F., Pistorello,M., Bradwin,G., Gomez-Sanchez,C.E., and Mortensen,R. (1996). Aldosterone-producing adenomas do not contain glucocorticoid-remediable aldosteronism chimeric gene duplications. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, **81**, 4310-4312.
15. Chai,W. and Danser,A.H. (2006). Why are mineralocorticoid receptor antagonists cardioprotective? *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **374**, 153-162.
16. Chen,X., Talley,E.M., Patel,N., Gomis,A., McIntire,W.E., Dong,B., Viana,F., Garrison,J.C., and Bayliss,D.A. (2006). Inhibition of a background potassium channel by Gq protein alpha-subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **103**, 3422-3427.
17. Cherradi,N., Brandenburger,Y., Rossier,M.F., Vallotton,M.B., Stocco,D.M., and Capponi,A.M. (1998). Atrial natriuretic peptide inhibits calcium-induced steroidogenic acute regulatory protein gene transcription in adrenal glomerulosa cells. *Mol. Endocrinol.*, **12**, 962-972.
18. Cherradi,N., Rossier,M.F., Vallotton,M.B., and Capponi,A.M. (1996). Calcium stimulates intramitochondrial cholesterol transfer in bovine adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.*, **271**, 25971-25975.
19. Cherradi,N., Rossier,M.F., Vallotton,M.B., Timberg,R., Friedberg,I., Orly,J., Wang,X.J., Stocco,D.M., and Capponi,A.M. (1997). Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome p450scc and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.*, **272**, 7899-7907.
20. Clarke,C.E., Veale,E.L., Green,P.J., Meadows,H.J., and Mathie,A. (2004). Selective block of the human 2-P domain potassium channel, TASK-3, and the native leak potassium current, IKSO, by zinc. *J. Physiol*, **560**, 51-62.
21. Condon,J.C., Pezzi,V., Drummond,B.M., Yin,S., and Rainey,W.E. (2002). Calmodulin-dependent kinase I regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase. *Endocrinology*, **143**, 3651-3657.

-
22. CONN, J.W. (1955). Presidential address. I. Painting background. II. Primary aldosteronism, a new clinical syndrome. *J. Lab Clin. Med.*, **45**, 3-17.
 23. Czirjak, G. and Enyedi, P. (2002a). Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J. Biol. Chem.*, **277**, 5426-5432.
 24. Czirjak, G. and Enyedi, P. (2002b). TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol. Endocrinol.*, **16**, 621-629.
 25. Czirjak, G., Fischer, T., Spat, A., Lesage, F., and Enyedi, P. (2000). TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol. Endocrinol.*, **14**, 863-874.
 26. Davies, L.A., Hu, C., Guagliardo, N.A., Sen, N., Chen, X., Talley, E.M., Carey, R.M., Bayliss, D.A., and Barrett, P.Q. (2008). TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 2203-2208.
 27. Decher, N., Maier, M., Dittrich, W., Gassenhuber, J., Bruggemann, A., Busch, A.E., and Steinmeyer, K. (2001). Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. *FEBS Lett.*, **492**, 84-89.
 28. Doyle, D.A., Morais, C.J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, **280**, 69-77.
 29. Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997). TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.*, **16**, 5464-5471.
 30. Enyeart, J.A., Danthi, S.J., and Enyeart, J.J. (2004). TREK-1 K⁺ channels couple angiotensin II receptors to membrane depolarization and aldosterone secretion in bovine adrenal glomerulosa cells. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.*, **287**, E1154-E1165.
 31. Fardella, C.E., Mosso, L., Gomez-Sanchez, C., Cortes, P., Soto, J., Gomez, L., Pinto, M., Huete, A., Oestreicher, E., Foradori, A., and Montero, J. (2000). Primary hyperaldosteronism in essential hypertensives: prevalence, biochemical profile, and molecular biology. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 1863-1867.
 32. Fardella, C.E., Pinto, M., Mosso, L., Gomez-Sanchez, C., Jalil, J., and Montero, J. (2001). Genetic study of patients with dexamethasone-suppressible aldosteronism without the chimeric CYP11B1/CYP11B2 gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86**, 4805-4807.
-

-
33. Ganguly,A. (1998). Primary aldosteronism. *N. Engl. J. Med.*, **339**, 1828-1834.
 34. Ganz,M.B., Nee,J.J., Isales,C.M., and Barrett,P.Q. (1994). Atrial natriuretic peptide enhances activity of potassium conductance in adrenal glomerulosa cells. *Am. J. Physiol*, **266**, C1357-C1365.
 35. Girard,C., Duprat,F., Terrenoire,C., Tinel,N., Fosset,M., Romey,G., Lazdunski,M., and Lesage,F. (2001). Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K(+) channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 249-256.
 36. Goldberg,R.B. (1983). Phenotypic modulation of adrenal cortical cells of the rat in primary culture. *Cell Tissue Res.*, **231**, 637-642.
 37. Gomez-Sanchez,C.E., Zhou,M.Y., Cozza,E.N., Morita,H., Foecking,M.F., and Gomez-Sanchez,E.P. (1997). Aldosterone biosynthesis in the rat brain. *Endocrinology*, **138**, 3369-3373.
 38. Gordon,R.D., Stowasser,M., Klemm,S.A., and Tunny,T.J.(1995). Primary aldosteronism--some genetic, morphological, and biochemical aspects of subtypes. *Steroids*, **60**, 35-41.
 39. Granger,J.P., Burnett,J.C., Jr., Romero,J.C., Opgenorth,T.J., Salazar,J., and Joyce,M. (1987). Elevated levels of atrial natriuretic peptide during aldosterone escape. *Am. J. Physiol*, **252**, R878-R882.
 40. Hajnoczky,G., Csordas,G., Hunyady,L., Kalapos,M.P., Balla,T., Enyedi,P., and Spat,A. (1992). Angiotensin-II inhibits Na⁺/K⁺ pump in rat adrenal glomerulosa cells: possible contribution to stimulation of aldosterone production. *Endocrinology*, **130**, 1637-1644.
 41. Hall,J.E., Granger,J.P., Smith,M.J., Jr., and Premen,A.J. (1984). Role of renal hemodynamics and arterial pressure in aldosterone "escape". *Hypertension*, **6**, I183-I192.
 42. Han,J., Truell,J., Gnatenco,C., and Kim,D. (2002). Characterization of four types of background potassium channels in rat cerebellar granule neurons. *J. Physiol*, **542**, 431-444.
 43. Hartness,M.E., Lewis,A., Searle,G.J., O'Kelly,I., Peers,C., and Kemp,P.J. (2001). Combined antisense and pharmacological approaches implicate hTASK as an airway O₂ sensing K(+) channel. *J. Biol. Chem.*, **276**, 26499-26508.
 44. Heitzmann,D., Derand,R., Jungbauer,S., Bandulik,S., Sterner,C., Schweda,F., El Wakil,A., Lalli,E., Guy,N., Mengual,R., Reichold,M., Tegtmeier,I., Bendahhou,S., Gomez-Sanchez,C.E., Aller,M.I., Wisden,W., Weber,A., Lesage,F., Warth,R., and Barhanin,J. (2008). Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. *EMBO J.*, **27**, 179-187.
-

-
45. Henriksen, J. H. Degradation of Bioactive Substances: Physiology and Pathophysiology. 1991. CRC Press.
 46. Hershkovitz,L., Beuschlein,F., Klammer,S., Krup,M., and Weinstein,Y. (2007). Adrenal 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the mouse catabolizes progesterone and 11-deoxycorticosterone and is restricted to the X-zone. *Endocrinology*, **148**, 976-988.
 47. Holloway,C.D., MacKenzie,S.M., Fraser,R., Miller,S., Barr,M., Wilkinson,D., Forbes,G.H., Friel,E., Connell,J.M., and Davies,E. (2008). Effects of genetic variation in the aldosterone synthase (CYP11B2) gene on enzyme function. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*.
 48. Holmes,P.V. and Dickson,A.D. (1971). X-zone degeneration in the adrenal glands of adult and immature female mice. *J. Anat.*, **108**, 159-168.
 49. Howard-Miller E. A transitory zone in the adrenal cortex which shows age and sex relationships. 40, 251-293. 1928. *Am J Anat*.
 50. Ibrahim,H.N. and Hostetter,T.H. (2003). Aldosterone in renal disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **12**, 159-164.
 51. Johnson,R.P., O'Kelly,I.M., and Fearon,I.M. (2004). System-specific O₂ sensitivity of the tandem pore domain K⁺ channel TASK-1. *Am. J. Physiol Cell Physiol*, **286**, C391-C397.
 52. Kang,D., Han,J., Talley,E.M., Bayliss,D.A., and Kim,D. (2004). Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells. *J. Physiol*, **554**, 64-77.
 53. Karschin,C., Wischmeyer,E., Preisig-Muller,R., Rajan,S., Derst,C., Grzeschik,K.H., Daut,J., and Karschin,A. (2001). Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K(+) channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system. *Mol. Cell Neurosci.*, **18**, 632-648.
 54. Keegan,C.E. and Hammer,G.D. (2002). Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends Endocrinol. Metab*, **13**, 200-208.
 55. Kim,Y., Bang,H., and Kim,D. (2000). TASK-3, a new member of the tandem pore K(+) channel family. *J. Biol. Chem.*, **275**, 9340-9347.
 56. Kurtz,L., Schweda,F., de Wit,C., Kriz,W., Witzgall,R., Warth,R., Sauter,A., Kurtz,A., and Wagner,C. (2007). Lack of connexin 40 causes displacement of renin-producing cells from afferent arterioles to the extraglomerular mesangium. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **18**, 1103-1111.

-
57. Le Goascogne,C., Sananes,N., Guezou,M., Takemori,S., Kominami,S., Baulieu,E.E., and Robel,P. (1991). Immunoreactive cytochrome P-450(17 alpha) in rat and guinea-pig gonads, adrenal glands and brain. *J. Reprod. Fertil.*, **93**, 609-622.
58. LeHoux,J.G. and Lefebvre,A. (2006). Novel protein kinase C-epsilon inhibits human CYP11B2 gene expression through ERK1/2 signalling pathway and JunB. *J. Mol. Endocrinol.*, **36**, 51-64.
59. Lesage,F. (2003). Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology*, **44**, 1-7.
60. Lesage,F., Guillemare,E., Fink,M., Duprat,F., Lazdunski,M., Romey,G., and Barhanin,J. (1996a). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J.*, **15**, 1004-1011.
61. Lesage,F. and Lazdunski,M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am. J. Physiol Renal Physiol*, **279**, F793-F801.
62. Lesage,F., Reyes,R., Fink,M., Duprat,F., Guillemare,E., and Lazdunski,M. (1996b). Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO J.*, **15**, 6400-6407.
63. Lifton,R.P., Dluhy,R.G., Powers,M., Rich,G.M., Gutkin,M., Fallo,F., Gill,J.R., Jr., Feld,L., Ganguly,A., Laidlaw,J.C., and . (1992). Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. *Nat. Genet.*, **2**, 66-74.
64. Lin,D., Sugawara,T., Strauss,J.F., III, Clark,B.J., Stocco,D.M., Saenger,P., Rogol,A., and Miller,W.L. (1995). Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science*, **267**, 1828-1831.
65. Linden,A.M., Aller,M.I., Leppa,E., Vekovischeva,O., Aitta-Aho,T., Veale,E.L., Mathie,A., Rosenberg,P., Wisden,W., and Korpi,E.R. (2006). The in vivo contributions of TASK-1-containing channels to the actions of inhalation anesthetics, the alpha(2) adrenergic sedative dexmedetomidine, and cannabinoid agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **317**, 615-626.
66. Lisurek,M. and Bernhardt,R. (2004). Modulation of aldosterone and cortisol synthesis on the molecular level. *Mol. Cell Endocrinol.*, **215**, 149-159.
67. Lopes,C.M., Rohacs,T., Czirjak,G., Balla,T., Enyedi,P., and Logothetis,D.E. (2005). PIP2 hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K⁺ channels. *J. Physiol*, **564**, 117-129.

-
68. Lopes,C.M., Zilberberg,N., and Goldstein,S.A. (2001). Block of Kcnk3 by protons. Evidence that 2-P-domain potassium channel subunits function as homodimers. *J. Biol. Chem.*, **276**, 24449-24452.
69. Lotshaw,D.P. (2001). Role of membrane depolarization and T-type Ca²⁺ channels in angiotensin II and K⁺ stimulated aldosterone secretion. *Mol. Cell Endocrinol.*, **175**, 157-171.
70. Lotshaw,D.P. (2006). Biophysical and pharmacological characteristics of native two-pore domain TASK channels in rat adrenal glomerulosa cells. *J. Membr. Biol.*, **210**, 51-70.
71. Lu,L., Suzuki,T., Yoshikawa,Y., Murakami,O., Miki,Y., Moriya,T., Bassett,M.H., Rainey,W.E., Hayashi,Y., and Sasano,H. (2004). Nur-related factor 1 and nerve growth factor-induced clone B in human adrenal cortex and its disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**, 4113-4118.
72. MacKenzie,S.M., Clark,C.J., Fraser,R., Gomez-Sanchez,C.E., Connell,J.M., and Davies,E. (2000). Expression of 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase genes in the rat brain. *J. Mol. Endocrinol.*, **24**, 321-328.
73. Maingret,F., Patel,A.J., Lazdunski,M., and Honore,E. (2001). The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K(+) channel TASK-1. *EMBO J.*, **20**, 47-54.
74. Makara,J.K., Koncz,P., Petheo,G.L., and Spat,A. (2003). Role of cell volume in K⁺-induced Ca²⁺ signaling by rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology*, **144**, 4916-4922.
75. Makhanova,N., Hagaman,J., Kim,H.S., and Smithies,O. (2008). Salt-sensitive blood pressure in mice with increased expression of aldosterone synthase. *Hypertension*, **51**, 134-140.
76. Medhurst,A.D., Rennie,G., Chapman,C.G., Meadows,H., Duckworth,M.D., Kellsell,R.E., Gloger,I.I., and Pangalos,M.N. (2001). Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **86**, 101-114.
77. Mesiano,S. and Jaffe,R.B. (1997). Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr. Rev.*, **18**, 378-403.
78. Meuth,S.G., Aller,M.I., Munsch,T., Schuhmacher,T., Seidenbecher,T., Meuth,P., Kleinschnitz,C., Pape,H.C., Wiendl,H., Wisden,W., and Budde,T. (2006). The contribution of TWIK-related acid-sensitive K⁺-containing channels to the function of dorsal lateral geniculate thalamocortical relay neurons. *Mol. Pharmacol.*, **69**, 1468-1476.
79. Mitani,F., Mukai,K., Miyamoto,H., Suematsu,M., and Ishimura,Y. (1999). Development of functional zonation in the rat adrenal cortex. *Endocrinology*, **140**, 3342-3353.
-

-
80. Mitani,F., Mukai,K., Miyamoto,H., Suematsu,M., and Ishimura,Y. (2003). The undifferentiated cell zone is a stem cell zone in adult rat adrenal cortex. *Biochim. Biophys. Acta*, **1619**, 317-324.
81. Mu,D., Chen,L., Zhang,X., See,L.H., Koch,C.M., Yen,C., Tong,J.J., Spiegel,L., Nguyen,K.C., Servoss,A., Peng,Y., Pei,L., Marks,J.R., Lowe,S., Hoey,T., Jan,L.Y., McCombie,W.R., Wigler,M.H., and Powers,S. (2003). Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell*, **3**, 297-302.
82. Mulatero,P., Veglio,F., Pilon,C., Rabbia,F., Zocchi,C., Limone,P., Boscaro,M., Sonino,N., and Fallo,F. (1998). Diagnosis of glucocorticoid-remediable aldosteronism in primary aldosteronism: aldosterone response to dexamethasone and long polymerase chain reaction for chimeric gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, **83**, 2573-2575.
83. Nussberger,J. (2003). Investigating mineralocorticoid hypertension. *J. Hypertens. Suppl*, **21**, S25-S30.
84. Ohnishi,T., Wada,A., Nonaka,Y., Okamoto,M., and Yamano,T. (1984). Effect of phospholipid on aldosterone biosynthesis by a cytochrome P-450(11) beta-reconstituted system. *Biochem. Int.*, **9**, 715-723.
85. Okamoto,M., Takemori,H., Halder,S.K., and Hatano,O. (1997). Zona glomerulosa-specific factor: cloning and function. *Steroids*, **62**, 73-76.
86. Ozaki,H.S., Iwahashi,K., Tsubaki,M., Fukui,Y., Ichikawa,Y., and Takeuchi,Y. (1991). Cytochrome P-45011 beta in rat brain. *J. Neurosci. Res.*, **28**, 518-524.
87. Parker,C.R., Jr., Mixon,R.L., Brissie,R.M., and Grizzle,W.E. (1997). Aging alters zonation in the adrenal cortex of men. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, **82**, 3898-3901.
88. Pascoe,L., Jeunemaitre,X., Lebrethon,M.C., Curnow,K.M., Gomez-Sanchez,C.E., Gasc,J.M., Saez,J.M., and Corvol,P. (1995). Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism and adrenal tumors occurring in a single French pedigree. *J. Clin. Invest*, **96**, 2236-2246.
89. Patel,A.J. and Honore,E. (2001). Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci.*, **24**, 339-346.
90. Paul,M., Poyan,M.A., and Kreutz,R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.*, **86**, 747-803.
91. Payne,A.H. and Hales,D.B. (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr. Rev.*, **25**, 947-970.
-

-
92. Pei,L., Wisner,O., Slavin,A., Mu,D., Powers,S., Jan,L.Y., and Hoey,T. (2003). Oncogenic potential of TASK3 (Kcnk9) depends on K⁺ channel function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **100**, 7803-7807.
 93. Perkins,L.M. and Payne,A.H. (1988). Quantification of P450_{scc}, P450(17) alpha, and iron sulfur protein reductase in Leydig cells and adrenals of inbred strains of mice. *Endocrinology*, **123**, 2675-2682.
 94. Perrone,R.D., Bengel,H.H., and Alexander,E.A. (1986). Sodium retention after adrenal enucleation. *Am. J. Physiol*, **250**, E1-12.
 95. Remuzzi,G., Perico,N., Macia,M., and Ruggenti,P. (2005). The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int. Suppl*, S57-S65.
 96. Reyes,R., Duprat,F., Lesage,F., Fink,M., Salinas,M., Farman,N., and Lazdunski,M. (1998). Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney. *J. Biol. Chem.*, **273**, 30863-30869.
 97. Romero,D.G., Yanes,L.L., de Rodriguez,A.F., Plonczynski,M.W., Welsh,B.L., Reckelhoff,J.F., Gomez-Sanchez,E.P., and Gomez-Sanchez,C.E. (2007). Disabled-2 is expressed in adrenal zona glomerulosa and is involved in aldosterone secretion. *Endocrinology*, **148**, 2644-2652.
 98. Roskelley,C.D. and Auersperg,N. (1990). Density separation of rat adrenocortical cells: morphology, steroidogenesis, and P-450_{scc} expression in primary culture. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **26**, 493-501.
 99. Rudolph,A.E., Blasi,E.R., and Delyani,J.A. (2000). Tissue-specific corticosteroidogenesis in the rat. *Mol. Cell Endocrinol.*, **165**, 221-224.
 100. Rusznak,Z., Pocsai,K., Kovacs,I., Por,A., Pal,B., Biro,T., and Szucs,G. (2004). Differential distribution of TASK-1, TASK-2 and TASK-3 immunoreactivities in the rat and human cerebellum. *Cell Mol. Life Sci.*, **61**, 1532-1542.
 101. Sausbier,M., Arntz,C., Bucurenciu,I., Zhao,H., Zhou,X.B., Sausbier,U., Feil,S., Kamm,S., Essin,K., Sailer,C.A., Abdullah,U., Krippeit-Drews,P., Feil,R., Hofmann,F., Knaus,H.G., Kenyon,C., Shipston,M.J., Storm,J.F., Neuhuber,W., Korth,M., Schubert,R., Gollasch,M., and Ruth,P. (2005). Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation*, **112**, 60-68.
 102. Spat,A. (2004). Glomerulosa cell--a unique sensor of extracellular K⁺ concentration. *Mol. Cell Endocrinol.*, **217**, 23-26.
-

103. Spat,A. and Hunyady,L. (2004). Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev.*, **84**, 489-539.
104. Spat,A., Rohacs,T., and Hunyady,L. (1994). Plasmalemmal dihydropyridine receptors modify the function of subplasmalemmal inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: a hypothesis. *Cell Calcium*, **15**, 431-437.
105. Stocco,D.M. and Clark,B.J. (1996). Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr. Rev.*, **17**, 221-244.
106. Stromstedt,M. and Waterman,M.R. (1995). Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **34**, 75-88.
107. Sun,T., Zhao,Y., Nonaka,Y., and Okamoto,M. (1995). Cloning and expression of cytochrome P450(11 beta) of porcine adrenal cortex. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **52**, 227-232.
108. Szabadkai,G., Varnai,P., and Enyedi,P. (1999). Selective inhibition of potassium-stimulated rat adrenal glomerulosa cells by ruthenium red. *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 209-218.
109. Tait,J.F. and Tait,S.A. (1999). Role of cAMP in the effects of K⁺ on the steroidogenesis of zona glomerulosa cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, **26**, 947-955.
110. Tanaka,S. and Matsuzawa,A. (1995). Comparison of adrenocortical zonation in C57BL/6J and DDD mice. *Exp. Anim*, **44**, 285-291.
111. Thomas,M., Northrup,S.R., and Hornsby,P.J. (1997). Adrenocortical tissue formed by transplantation of normal clones of bovine adrenocortical cells in scid mice replaces the essential functions of the animals' adrenal glands. *Nat. Med.*, **3**, 978-983.
112. Tremblay,E., Payet,M.D., and Gallo-Payet,N. (1991). Effects of ACTH and angiotensin II on cytosolic calcium in cultured adrenal glomerulosa cells. Role of cAMP production in the ACTH effect. *Cell Calcium*, **12**, 655-673.
113. Varnai,P., Petheo,G.L., Makara,J.K., and Spat,A. (1998). Electrophysiological study on the high K⁺ sensitivity of rat glomerulosa cells. *Pflugers Arch.*, **435**, 429-431.
114. Wada,A., Ohnishi,T., Nonaka,Y., Okamoto,M., and Yamano,T. (1985). Synthesis of aldosterone by a reconstituted system of cytochrome P-45011 beta from bovine adrenocortical mitochondria. *J. Biochem.*, **98**, 245-256.

-
115. Wang,X.Y., Masilamani,S., Nielsen,J., Kwon,T.H., Brooks,H.L., Nielsen,S., and Knepper,M.A. (2001). The renal thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as mediator of the aldosterone-escape phenomenon. *J. Clin. Invest.*, **108**, 215-222.
116. Warth,R., Barriere,H., Meneton,P., Bloch,M., Thomas,J., Tauc,M., Heitzmann,D., Romeo,E., Verrey,F., Mengual,R., Guy,N., Bendahhou,S., Lesage,F., Poujeol,P., and Barhanin,J. (2004). Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K⁺ channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 8215-8220.
117. White,P.C., Curnow,K.M., and Pascoe,L. (1994). Disorders of steroid 11 beta-hydroxylase isozymes. *Endocr. Rev.*, **15**, 421-438.
118. Wotus,C., Levay-Young,B.K., Rogers,L.M., Gomez-Sanchez,C.E., and Engeland,W.C. (1998). Development of adrenal zonation in fetal rats defined by expression of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase. *Endocrinology*, **139**, 4397-4403.
119. Wunderlich,F., Dkhil,M.A., Mehnert,L.I., Braun,J.V., El Khadragey,M., Borsch,E., Hermsen,D., Benten,W.P., Pfeffer,K., Mossmann,H., and Krucken,J. (2005). Testosterone responsiveness of spleen and liver in female lymphotoxin beta receptor-deficient mice resistant to blood-stage malaria. *Microbes. Infect.*, **7**, 399-409.
120. Yang,J., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (1995). Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel. *Neuron*, **15**, 1441-1447.
121. Yoshimura,M., Nakamura,S., Ito,T., Nakayama,M., Harada,E., Mizuno,Y., Sakamoto,T., Yamamuro,M., Saito,Y., Nakao,K., Yasue,H., and Ogawa,H. (2002). Expression of aldosterone synthase gene in failing human heart: quantitative analysis using modified real-time polymerase chain reaction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 3936-3940.
122. Young,L.S., Murphy,G., Kelly,S.N., Smith,T.P., Cunningham,S.K., and Joseph,M.T. (2003). Differential production of adrenal steroids by purified cells of the human adrenal cortex is relative rather than absolute. *Eur. J. Endocrinol.*, **148**, 139-145.
123. Young,W.F. (2007). Primary aldosteronism: renaissance of a syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, **66**, 607-618.
124. Zubair,M., Ishihara,S., Oka,S., Okumura,K., and Morohashi,K. (2006). Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development: initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 complex and maintenance via autoregulation by Ad4BP/SF-1. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 4111-4121.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1(↑): Schema des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS)	6
Abb. 2: Histologische und funktionelle Zonierung der Nebenniere	9
Abb. 3(↑): Stellung der Aldosteronsynthese im Stoffwechsel der Nebenniere	12
Abb. 4: Regulation der Aldosteronsekretion	16
Abb. 5: Struktur von 2-P-Domänen Kaliumkanälen	19
Abb. 6: Plasma-Aldosteron unter verschiedenen Salzdiäten (Einfluss von TASK1)	37
Abb. 7(↑): Renin-Aktivität im Plasma und renale Renin-Expression.....	39
Abb. 8: Plasma K^+ und ENaC-Aktivität im distalen Kolon.....	40
Abb. 9: Blutdruck und Herzfrequenz, Einfluss des Aldosteron-Antagonisten Canrenoat.....	42
Abb. 10: Immunfluoreszenzfärbungen der Aldosteronsynthase in Nebennieren adulter Mäuse	43
Abb. 11: Lokalisation und Expressionsstärke der Aldosteronsynthase bei K^+ -reicher Diät.....	45
Abb. 12: Einfluss des Glukokortikoids Dexamethason auf die Plasma-Aldosteronkonzentration	46
Abb. 13: Altersabhängige Lokalisation der Aldosteronsynthase in der Nebenniere (WT/ <i>task1</i> ^{-/-}).....	49
Abb. 14: Einfluss von Kastration, Östrogen und Testosteron auf die Nebennierenzonierung	50
Abb. 15: Patch-Clamp-Messungen im Whole-cell-Modus an adrenokortikalen Zellen.....	52
Abb. 16: Plasma-Aldosteron unter verschiedenen Salzdiäten (Einfluss von TASK3)	54
Abb. 17: Altersabhängigkeit von Plasma-Aldosteron in <i>task3</i> ^{-/-} Mäusen.....	55
Abb. 18: Altersabhängige Lokalisation der Aldosteronsynthase in der Nebenniere (<i>task3</i> ^{-/-}).....	56
Abb. 19 (↑): Modell zur dynamischen Zonierung der Nebenniere bei <i>task1</i> ^{-/-} Mäusen.....	62

(↑)

bedeutet, dass sich die Legende der Abb. auf dieser Seite, die Grafik selbst auf der vorherigen Seite befindet.

9 Abkürzungsverzeichnis

Gängige Abkürzungen aus der Molekularbiologie, S.I.-Einheiten, davon abgeleitete Einheiten und Formelzeichen der Elemente werden als bekannt vorausgesetzt.

Abkürzung	Bezeichnung
[Ca ²⁺] _z	zytoplasmatische Calcium-Konzentration
4-AP	4-Aminopyridin
ACE	Angiotensin-I-Conversionsenzym
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ADH	antidiuretischen Hormons
Ak	Antikörper
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AT1-Rezeptor	Angiotensin II - Rezeptor Typ 1
CaMK	Calcium/Calmodulin-abhängige Protein Kinase
CC-zero	Current-Clamp-Zero-Modus
CGN	cerebellar granule neurons
CYP	Cytochrom-P450-Enzyme
CYP11B1	11β-Hydroxylase
CYP11B2	Aldosteronsynthase
d	Tag
DAG	Diacylglycerin
ER	Endoplasmatisches Reticulum
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenasen
i.p.	intraperitoneal
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ISH	In-situ-Hybridisierung
K2P-K ⁺ -Kanäle	2-P-Domänen Kaliumkanäle
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
PFA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Polyethylen
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RIA	Radioimmunoassay
RT	Raumtemperatur
s.c.	subcutan
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
StAR	steroidogenic acute regulating Protein
TALK	TWIK-related Alkaline-pH-activated K ⁺ channel
TASK	TWIK-related Acid Sensitive K ⁺ channels
TEA	Tetraethylammonium
TRAAK	TWIK-related arachidonic acid stimulated K ⁺ channel
TWIK	Tandem of P domains in a Weak Inward rectifying K ⁺ channel
ÜN	über Nacht
Wo	Woche

10 Anhang

10.1 Bisherige Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Veröffentlichungen:

Heitzmann D, Derand R, Jungbauer S, **Bandulik S**, Sterner C, Schweda F, El Wakil A, Lalli E, Guy N, Mengual R, Reichold M, Tegtmeier I, Bendahhou S, Gomez-Sanchez CE, Aller MI, Wisden W, Weber A, Lesage F, Warth R, Barhanin J.

Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis

EMBO J., 27, 179-187. (2008)

Schifferer R, Liebisch G, **Bandulik S**, Langmann T, Dada A, Schmitz G.

ApoA-I induces a preferential efflux of monounsaturated phosphatidylcholine and medium chain sphingomyelin species from a cellular pool distinct from HDL(3) mediated phospholipid efflux.

Biochim. Biophys. Acta, 1771, 853-863. (2007)

Orsó E, Werner T, Wolf Z, **Bandulik S**, Kramer W, Schmitz G

Ezetimib influences the expression of raft-associated antigens in human monocytes

Cytometry A, 69, 206-208. (2006)

Publikationen in Vorbereitung:

Bockenbauer D, Sally Feather, Stanescu HC, **Bandulik S**, Zdebik A, Reichold M, Tobin J, Lieberer E, Sterner C, Landouere G, Arora R, Sirimanna T, Thompson D, Cross JH, van't Hoff W, Al Masri O, Tullus K, Yeung S, Anikster Y, Klootwijk E, Hubank M, Dillon MJ, Heitzmann D, Arcos-Burgos M, Knepper MA, Dobbie A, Gahl WA, Warth R, Sheridan E, Kleta R

A new syndrome presenting with epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, and tubulopathy (EAST syndrome) due to mutations in KCNJ10

submitted (2008)

Bandulik S, Reichold M, Sterner C, Tegtmeier I, Engl T, Warth R, Heitzmann D

ENaC and sodium independent potassium elimination in mice

In Vorbereitung

Kongressbeiträge (präsentierte Poster und Vorträge):

Bandulik S, Reichold M, Sterner C, Engl T, Krämer BK, Warth R, Heitzmann D

ENaC and Na⁺ independent K⁺ elimination in mice

Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2008 in Köln – Poster

Heitzmann D, Derand R, Jungbauer S, **Bandulik S**, Sterner C, Schweda F, Lalli E, Guy N, Mengual R, Reichold M, Tegtmeier I, Bendahhou S, Gomez-Sanchez CE, Aller I, Wisden W, Lesage F, Warth R, Barhanin J.

TASK1-K⁺-Kanäle determinieren die Zonierung der Nebenniere und die Mineralocorticoid-Homöostase

Kongress der Gesellschaft für Nephrologie 2007 in München – Vortrag

Bandulik S, Reichold M, Engl T, Warth R, Heitzmann D

New aspects of renal potassium excretion

Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2007 in Hannover – Vortrag

Heitzmann D, **Bandulik S**, Reichold M, Tegtmeier I, Sterner C, Warth R

Neue Einblicke in die Mechanismen der renalen Kaliumausscheidung

Kongress der Gesellschaft für Nephrologie 2006 in Essen – Poster

S. Bandulik, G. Liebisch and G. Schmitz

ApoA-I mediated cholesterol efflux in primary human fibroblasts is linked to association of ABCA1 with membrane microdomains

30th FEBS Congress – 9th IUBMB Conference 2005 in Budapest – Poster

10.2 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Sascha
Vorname: Bandulik
Geburtsdatum: 12.03.1978
Geburtsort: Magdeburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Wohnsitz: Sternbergstrasse 26 a
93053 Regensburg
Familienstand: Verheiratet
Konfession: keine

SCHULBILDUNG

1984-1986: Goethe-Schiller-Schule Magdeburg
1986-1991: Juri-Gagarin-Schule Magdeburg
1991-1996: Humboldt-Gymnasium Magdeburg
22.06.1996: Ende der Schulausbildung, allg. Abitur

ZIVILDIENTST

1996-1997: Zivildienst in der Lungenklinik Lostau

STUDIUM

1998-2003: Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
Jan-Okt 2003: Diplomarbeit am Institut für Immunologie der Universität
Halle mit dem Thema „Untersuchungen zur Expression und
Funktion von CD10 im Schilddrüsenkarzinom“
13.10.2003: Erlangung des akademischen Grades „Diplom-Biochemiker“

PROMOTION

2004: Beginn des Promotionsstudiums am Lehrstuhl für Klinische
Chemie und Laboratoriumsmedizin des
Universitätsklinikums Regensburg
01.02.2006: Fortsetzung des Promotionsstudiums am Institut für
Physiologie bei Professor Dr. Warth an der Universität
Regensburg, NWF III/VKL

10.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die im Methodenteil und in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Diese Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....

Sascha Bandulik

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Warth für die Überlassung des Themas, die umfassende wissenschaftliche Betreuung sowie die Bereitstellung der Mittel zur Durchführung der Arbeit. Seine stete Diskussionsbereitschaft und sein Ideenreichtum haben die wissenschaftliche Arbeit immer wieder neu befruchtet. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Jaques Barhanin (CNRS, Sophia Antipolis, Frankreich) für die Durchführung der Corticosteron-Messungen herzlich bedanken. Frank Schweda vom Institut für Physiologie der Universität Regensburg sei herzlich für die Renin-Messungen gedankt. Mein Dank gilt auch Stefan Jungbauer, dessen Blutdruckmessungen ich hier verwenden durfte. Für die Bereitstellung der knockout Mausstämme möchte ich mich bei W. Wisden (IZN, Universität Heidelberg; *task1^{-/-}*) und Dr. F. Lesage (CNRS, Sophia-Antipolis, Frankreich; *task3^{-/-}*) bedanken. Außerdem sei auch Herrn Prof. Dr. Göpferich vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie in Regensburg für die Bereitstellung des konfokalen Mikroskops gedankt. Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Laborkollegen Markus, Diego, David, Christina und Ines welche mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Herzlichen Dank auch für die harmonische und unkomplizierte Laboratmosphäre, zu der jeder seinen Beitrag geleistet hat.

Meiner Frau, die mich mit durch diese herausfordernde Zeit begleitet hat, gilt mein größter Dank.