

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MEDIZINISCHE ZELLBIOLOGIE, INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE  
PROF. DR. RICHARD WARTH  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Untersuchungen zur Bedeutung von Kaliumkanälen  
für die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der  
Aldosteronproduktion bei *Task1<sup>-/-</sup>* Mäusen

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Anna-Sophia Kattner, geb. Haubs*

2016

*Meinem Vater und Meinem Mann*

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MEDIZINISCHE ZELLBIOLOGIE, INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE  
PROF. DR. RICHARD WARTH  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Untersuchungen zur Bedeutung von Kaliumkanälen  
für die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der  
Aldosteronproduktion bei *Task1<sup>-/-</sup>* Mäusen

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Anna-Sophia Kattner, geb. Haubs*

2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Richard Warth

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Claus Hellerbrand

Tag der mündlichen Prüfung: 5.7.2016

---

## Inhaltsverzeichnis

---

1. Einleitung.....	4
1.1. Aufbau und Funktion der Nebenniere.....	4
1.2. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	6
1.3. Aldosteron .....	8
1.4. Für diese Arbeit wichtige Kalium-Kanäle .....	14
1.4.1. TASK-Kanäle .....	15
1.4.2. TREK-Kanäle.....	15
1.4.3. KCNQ1-Kanäle und ihre Untereinheiten.....	17
1.4.4. maxiK/KCNMA1-Kanal.....	18
1.4.5. KCNJ5 .....	19
1.5. Pathophysiologie: Aldosteron und Bluthochdruck.....	20
1.6. Phänotyp der <i>Task</i> Knockout-Mäuse mit Schwerpunkt auf <i>Task1<sup>-/-</sup></i> .....	23
2. Zielsetzung und Fragestellung.....	25
3. Material und Methoden .....	26
3.1. Material.....	26
3.1.1. Geräte.....	26
3.1.2. Verbrauchsmaterial.....	27
3.1.3. Chemikalien, Arzneimittel, Hormone.....	27
3.1.4. Kits/Enzyme.....	28
3.1.5. Oligonukleotide .....	29
3.1.6. Antikörper/Fluoreszenzfarbstoffe .....	30
3.1.7. Puffer und Lösungen.....	31
3.2. Methoden.....	33
3.2.1. Verwendete Mäuse und Diät.....	33
3.2.2. Plasma- und Organgewinnung .....	33
3.2.3. Plasmaaldosteron .....	34
3.2.4. Immunfluoreszenzfärbung .....	34
3.2.5. RNA-Isolierung .....	35

3.2.6. Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	36
3.2.7. Realtime-PCR.....	36
3.2.8. Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot .....	37
3.2.9. In-vivo Einfluss des KCNQ1-Blockers HMR 1556 auf die Aldosteronausschüttung .....	38
3.2.10. Kastration und Testosterongabe bei Wildtypmännchen.....	39
3.2.11. Statistik .....	40
4. Ergebnisse: Phänotypisierung der <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäuse .....	41
4.1. Charakterisierung des adrenalen Phänotyps der <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäuse.....	42
4.1.1 Plasmaaldosteronkonzentrationen.....	42
4.1.2. Cyp11b2-mRNA-Expressionen.....	43
4.1.3. Aldosteronsynthese in Immunfluoreszenzfärbungen .....	45
4.1.4. Breite der Zona glomerulosa.....	47
4.1.5. Cyp11b1-mRNA-Expressionen .....	48
4.2. mRNA-Expression verschiedener, potentiell kompensatorisch wirksamer K <sup>+</sup> -Kanäle .....	49
4.2.1. Kcnq1.....	50
4.2.2. Kcne3.....	51
4.2.3. Kcne4.....	53
4.2.4. Trek1.....	54
4.2.5. Kcnma1 (maxiK) .....	55
4.2.6. Task3 .....	56
4.2.7. Task2 .....	57
4.3. Immunfluoreszenzfärbungen von Kcnq1 und Task3.....	58
4.3.1. Lokalisation von Kcnq1 in der Nebenniere von wildtyp und <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....	58
4.3.2. Lokalisation von Task3 in der Nebenniere von wildtyp und <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....	60
4.4. Western-Blot: Analyse der Proteinexpression von Kcnq1 und Kcnma1....	62
4.4.1. Kcnq1-Proteinexpression bei <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> und Wildtypmäusen .....	62
4.4.2. Kcnma1 (maxiK) Proteinexpression bei <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> und Wildtypmäusen .....	63

4.5. In-vivo Einfluss des KCNQ1-Blockers HMR 1556 auf die Aldosteronausschüttung .....	65
4.5.1. Der Einfluss von Synacthen auf die Aldosteronkonzentration.....	67
4.5.2. Der Einfluss von HMR auf die Aldosteronkonzentration von normal-Diät und hoch-Kalium-Diät Mäusen .....	68
5. Diskussion .....	70
5.1. Hyperaldosteronismus und Dezonierung der Aldosteronsynthase bei <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Weibchen.....	71
5.2. Dem Hyperaldosteronismus und der Dezonierung der Aldosteronsynthase entgegenwirkende Kaliumkanäle.....	74
5.3. Ausblick .....	82
6. Zusammenfassung .....	84
7. Quellen .....	86
8. Abbildungsverzeichnis .....	96
9. Abkürzungsverzeichnis .....	98
10. Anhang .....	101

## 1. Einleitung

---

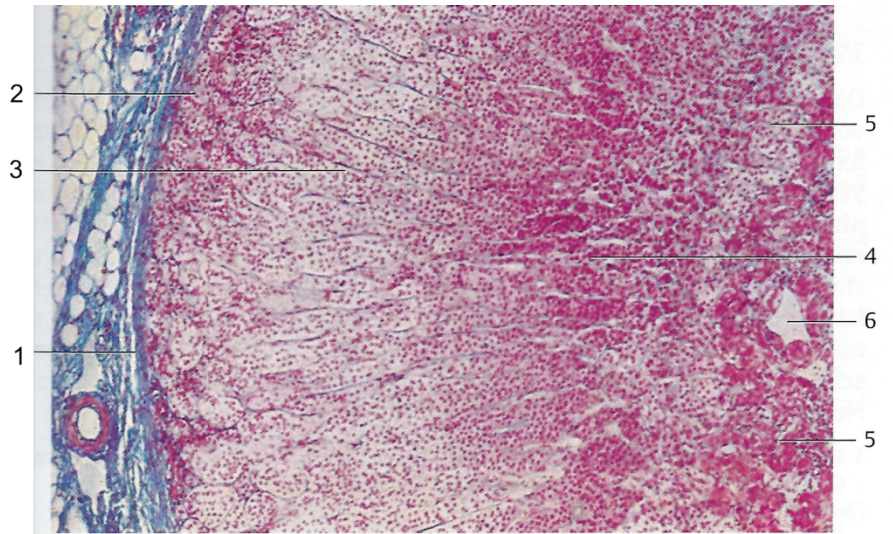
### 1.1. Aufbau und Funktion der Nebenniere

---

Die Nebenniere (auch Glandula suprarenalis genannt) ist ein paariges Organ, das sich jeweils am oberen Pol der Niere befindet. Sie kann aufgeteilt werden in die Nebennierenrinde, in der v.a. Steroidhormone synthetisiert werden, und das Nebennierenmark, das ein Teil des sympathischen Nervensystems darstellt. Für diese Arbeit ist v.a. die Nebennierenrinde von großer Bedeutung, deshalb wird hier in erster Linie auf sie eingegangen. Diese kann von außen nach innen in drei Zonen aufgeteilt werden: die Zona glomerulosa, welche Mineralokortikoide (v.a. Aldosteron) synthetisiert, die Zona fasciculata, die Glukokortikoide (v.a. Cortisol) synthetisiert, und die Zona reticularis, die Androgene (v.a. Dehydroepiandrosteron = DHEA) produziert. Die letzte und innerste Zone kann bei Mäusen funktionell nicht abgegrenzt werden, da sie nach der Geburt kein Cyp17 produzieren, welches für die Androgensynthese notwendig ist (1;2). Das aktive Cortisol, welches in viel größeren Mengen im Plasma vorliegt als das inaktive Cortison, kann neben dem Glukokortikoidrezeptor auch an den Mineralokortikoidrezeptor binden und so eine mineralokortikoide Wirkung entfalten. Um diesen Effekt zu vermindern wird Cortisol in der Niere in Cortison umgewandelt. Bei Mäusen wird in der Zona fasciculata statt Cortisol das Glukokortikoid Corticosteron gebildet. Die drei unterschiedlichen Zonen werden auf unterschiedliche Art und Weise reguliert. Die Aldosteron produzierende, äußerste Zone unterliegt hauptsächlich dem Renin-Angiotensin-System, die anderen beiden Zonen dagegen dem ACTH (Adrenocorticotropes Hormon/Kortikotropin), ein aus dem Hypophysenvorderlappen freigesetztes Peptidhormon, welches aus einem Vorläufermolekül namens POMC (Proopiomelanocortin) entsteht. Außerdem hat das luteinisierende Hormon (LH) Einfluss auf die Zona reticularis sowie auf die Zona fasciculata. Dort stimuliert es bei Ratten die Corticosteron- und DHEA-synthese (3). ACTH ist außerdem wichtig für die Zonierung der Nebennierenrinde und die Bereitstellung von Cholesterin als Ausgangssubstanz für die Steroidhormonsynthese. Während die Rinde



entwicklungsgeschichtlich aus dem Mesoderm stammt, entsteht das Mark aus dem Neuroektoderm und stellt später das postganglionäre Neuron sympathischer Nervenstränge dar. Als Endorgan des Sympathikus sezernieren die Nebennierenmarkzellen Adrenalin und Noradrenalin. Pränatal besitzt die Nebenniere außerdem eine sogenannte fetale Zone zwischen Rinde und Mark, die ebenfalls dem ACTH unterliegt und DHEAS (Dehydroepiandrosteronsulfat) produziert, welches in utero von der Plazenta zur Estrogensynthese verwendet wird (4). Diese fetale Zone bildet sich bei Menschen postnatal bis zum dritten Lebensmonat zurück. Die Regression der fetalen Zone ist bei der Maus dagegen schon mit der Geburt abgeschlossen. Zusätzlich findet man bei der Maus eine sog. Zone-X, die sich postnatal nach etwa 10-14 Tagen bildet und bei Männchen mit der Pubertät (ca. 38 Tage pp), bei den Weibchen erst mit der ersten Schwangerschaft verschwindet (1;5;6). Die Zellen der Zona glomerulosa, die eine kleine Schicht unter der Kapsel darstellt, sind in kleinen Konglomeraten angeordnet, während die Zellen der Zona fasciculata, welche die größte Schicht darstellt, in Säulen angeordnet sind und sehr viele Lipidtröpfchen enthalten. Die für steroidhormonproduzierende Zellen charakteristischen Lipidtröpfchen enthalten Cholesterinester als Ausgangsstoff für die Steroidhormonsynthese. Die Endhormone können nicht zwischengelagert werden sondern werden bei Bedarf neu synthetisiert. Zwischen den Säulen verlaufen Sinusoide. Die innerste Schicht (Zona reticularis) enthält kleinere, netzartig angeordnete, azidophile (sich mit sauren Farbstoffen anreichernde) Zellen.



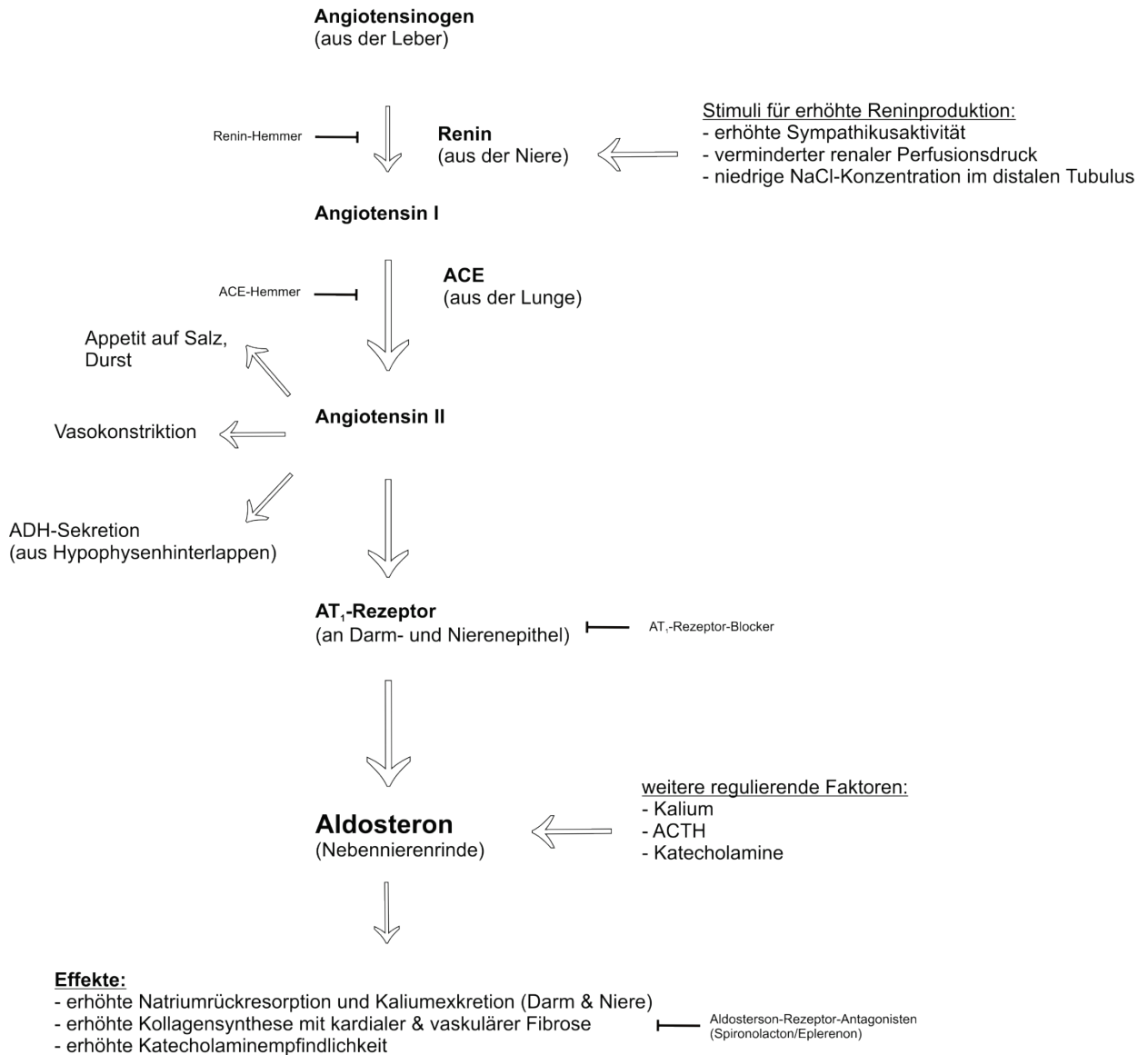
**Abbildung 1: Aufbau der menschlichen Nebenniere**

1: Kapsel; 2: Zona glomerulosa: in Konglomeraten angeordnete Zellen, die Mineralokortikoide bilden; 3: Zona fasciculata: in Säulen angeordnete Zellen, die Glukokortikoide produzieren; 4: Zona reticularis: enthält Zellen, die Androgene bilden; 5: Nebennierenmark: Adrenalin- und Noradrenalinfreisetzung; 6: Markvene. Aus: „*Taschenatlas Histologie*“, Wolfgang Kühnel, S. 259, 12. Auflage, Thieme.

## 1.2. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Essentiell für die Regulation des Blutdrucks ist das Hormon Aldosteron, welches sowohl zu einer erhöhten Natriumrückresorption im Sammelrohr der Niere und im Darm als auch zu einer Kaliumsekretion führt. Der Hauptregulator der Aldosteronsynthese und –freisetzung ist das Renin-Angiotensin-System (RAS). Sowohl ein Blutdruckabfall, welcher an Pressorezeptoren in den afferenten Arteriolen der Glomeruli der Niere gemessen wird, als auch die Wirkung des Sympathikus über  $\beta_1$ -Adrenozeptoren führen zu einer Reninfreisetzung aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere. Ein Abfall der NaCl-Konzentration in der Tubulusflüssigkeit oder eine niedrige Flussgeschwindigkeit an der Macula Densa, dem Salzsensoren der Niere, führt ebenfalls zur Reninausschüttung. Umgekehrt hemmen hohe NaCl- und Angiotensin II-Spiegel und eine hohe Volumenbelastung die Reninausschüttung. Renin ist eine Protease, die das im Plasma vorhandene Angiotensinogen zu Angiotensin I spaltet. Angiotensin I wird durch das v.a. in Endothelzellen der Lunge vorkommende Enzym angiotensin converting enzyme (ACE) in das wirksame Angiotensin II (Ang II) umgewandelt. Angiotensin II bewirkt im Hypothalamus Durstgefühl, ADH-Ausschüttung, Appetit auf NaCl (Kochsalz), eine Vasokonstriktion und die Ausschüttung von Aldosteron aus der

Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Das durch Aldosteron vermehrt resorbierte Natrium steigert den Blutdruck. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Aldosteron auch direkt an den Gefäßen wirkt. Auch in anderen Geweben wie Gehirn, Nebennieren und Gefäßen wurde das RAAS beobachtet (7).



### Abbildung 2: Das Renin-Angiotensin-System.

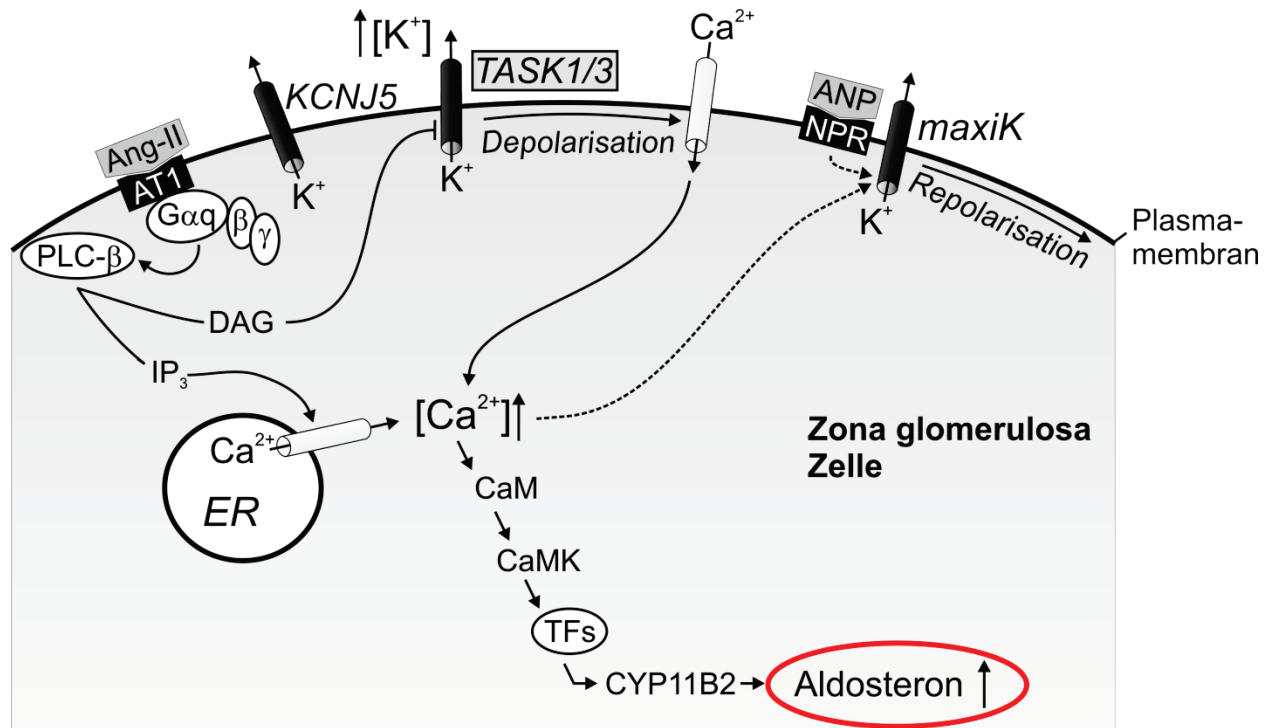
Das durch einen niedrigen Blutdruck oder Salzangel freigesetzte Renin spaltet Angiotensinogen, sodass Angiotensin I entsteht, welches wiederum durch das Enzym ACE in Angiotensin II umgewandelt wird. Angiotensin II steigert das Durstgefühl und den Salzappetit und führt zur Vasokonstriktion sowie zur Aldosteronfreisetzung. Aldosteron wiederum erhöht über eine Rückresorption von Natrium in Darm und Niere den Blutdruck.

### 1.3. Aldosteron

---

Das mineralokortikoide Hormon Aldosteron hat große Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System und kann, wenn es in inadäquater Menge gebildet wird, zu schweren Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems führen (s. Kapitel Pathophysiologie). Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, die Ursachen für einen Hyperaldosteronismus zu eruieren und die Pathomechanismen der Aldosteronsekretion zu verstehen. Es gibt viele Faktoren, die die Freisetzung von Aldosteron aus den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde beeinflussen. Die wichtigsten Stimulatoren für die Aldosteronfreisetzung sind Ang II, hohes extrazelluläres Kalium und ACTH, während ANP (atriales natriuretisches Peptid) sie hemmt. Auf zellulärer Ebene ist für die Aldosteronfreisetzung das Membranpotential entscheidend. Dieses wiederum wird durch Kanäle kontrolliert und durch Elektrolytverschiebungen beeinflusst. Besonders wichtig für das Membranpotential der Glomerulosazellen der Nebennierenrinde sind die Kaliumkanäle TASK1 (TWIK related acid sensitive K<sup>+</sup> channel) und TASK3 (8-12). Die Leitfähigkeit dieser Kaliumkanäle ist für das Membranpotential von entscheidender Bedeutung. Die hohe Kaliumleitfähigkeit verleiht den Glomerulosazellen ein im Vergleich zu den anderen Zellen des Körpers stark hyperpolarisiertes Membranpotential von ca. -80 mV. Auf die relevanten Regulationswege soll nun im Einzelnen näher eingegangen werden.

Bindet das durch Renin und ACE (Angiotensin converting enzyme) gebildete Ang II an den G-Protein gekoppelten AT<sub>1</sub>-Rezeptor, wird eine Signalkaskade bestehend aus G<sub>αq</sub>, Phospholipase C<sub>β</sub>, PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositolbisphosphat), DAG (Diacylglycerin) und Proteinkinase C (PKC) in Gang gesetzt, wobei DAG die TASK-Kanäle hemmt (9;12;13). Dadurch nimmt die fraktionelle Leitfähigkeit von Kalium ab, sodass das Membranpotential depolarisiert. Das wiederum aktiviert spannungsabhängige Kalziumkanäle (v.a. T-Typ Kanäle), die einen Kalziumeinstrom von extrazellulär bewirken. Zusätzlich wird durch Ang II die Aktivierungsschwelle der Kalziumkanäle herabgesetzt, was diesen Mechanismus weiter begünstigt.



**Abbildung 3: Wirkmechanismus des Ang II auf die Aldosteronproduktion.**

Über die  $\alpha_q$  Untereinheit des von Ang II aktivierten AT<sub>1</sub>-Rezeptors (G-Protein) wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die über G<sub>αq</sub>, Phospholipase C (PLC) und Diacylglycerin (DAG) zu einer Hemmung der TASK-Kanäle führt, das Membranpotential anhebt und eine Depolarisation begünstigt. Neuere Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung der TASK-Kanäle über Diacylglycerin (DAG) geschieht (13). maxiK-Kanäle werden durch ANP, welches an den natriuretischen Peptidrezeptor (NPR) bindet, aktiviert. Außerdem führt eine erhöhte Kalziumkonzentration zu einer Aktivierung. Die Aktivierung von maxiK-Kanälen wiederum führt zu einer Repolarisation des Membranpotentials. ANP = atriales natriuretisches Peptid, IP<sub>3</sub> = Inositoltrisphosphat, ER = endoplasmatisches Retikulum, CaM = Kalzium-Calmodulin, CaMK = Kalzium-Calmodulin-Kinase, TFs = Transkriptionsfaktoren. Modifiziert nach (14).

Neben der Hemmung von TASK- und TREK (TWIK related K<sup>+</sup> channel)-Kanälen gibt es noch einen zweiten Weg, der zu einer Kalziumfreisetzung in der Zelle führt. Kommt es zur Bindung eines Ang II Moleküls an den G-Protein-gekoppelten Angiotensin-Rezeptor 1 (AT<sub>1</sub>-R), so wird die Phospholipase C aktiviert, die wiederum zur Bildung von IP<sub>3</sub> und DAG führt. IP<sub>3</sub> führt nun über einen weiteren Weg zur Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher. Am Ende beider Wege bildet das freigesetzte Kalzium zusammen mit Calmodulin einen Komplex. Der Kalziumcalmodulinkomplex wiederum aktiviert durch Phosphorylierung verschiedene Transkriptionsfaktoren wie CREB (CRE-binding-protein), ATF-1 (cAMP-dependent transcription factor) und ATF-2 (12). Diese binden an CRE (cAMP response element) des CYP11B2-Gens und bringen die Transkription der Aldosteronsynthese in Gang, welche die letzten drei Schritte der Aldosteronsynthese katalysiert.

Neben Ang II ist das Plasmakalium der wichtigste Regulator für die Aldosteronproduktion, was auch im Sinne eines Feedbackmechanismus steht, denn Aldosteron führt bekannter Weise zur Kaliumausscheidung. Das hohe extrazelluläre Kalium depolarisiert die Zona Glomerulosa Zellen, sodass sich anschließend die spannungsabhängigen Kalziumkanäle vom T-Typ in der Membran öffnen. Dies führt zu einem raschen intrazellulären Kalziumanstieg. Dies wiederum führt wie oben bereits beschrieben zur Bildung von Kalzium-Calmodulin-Komplexen, die durch Phosphorylierung Transkriptionsfaktoren aktivieren und so zur Aldosteronproduktion und -freisetzung beitragen.

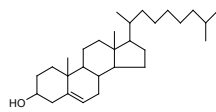
V.a. die Glukokortikoidproduktion unterliegt dem Regulatorhormon ACTH (adrenocorticotropes Hormon), aber auch für eine normale Aldosteronproduktion ist ACTH erforderlich (15). Außerdem ist ACTH wichtig für die Differenzierung der Nebenniere und deren Durchblutung. Ein akuter ACTH-Anstieg führt zur vermehrten Aldosteronausschüttung via cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat)-Anstieg. Eine chronische Erhöhung der ACTH-Konzentration führt zur Hypertrophie und Hyperplasie der Zona fasciculata und vermindert die Aldosteronkonzentration sogar (16).

Innerhalb von Minuten nach Eintreffen des Ang II-Signals wird Aldosteron ausgeschüttet. Diese schnelle Aldosteronantwort wird wahrscheinlich durch gespeicherte Ausgangsstoffe wie Cholesterinester und durch StAR-Protein-Aktivierung ermöglicht (7;7;17). Das StAR-Protein (steroidogenic acute regulatory protein) ist für den Transport von Cholesterin durch die äußere zur inneren Mitochondrienmembran zuständig (7;18). Patienten, die dieses Protein nicht besitzen, können keine Steroidhormone produzieren (17). Aldosteron wird in den Zellen der Zona glomerulosa aus Cholesterin, der Ausgangssubstanz aller Steroidhormone, synthetisiert. Ist Cholesterin durch das StAR-Protein an die innere Mitochondrienmembran gelangt, wird es durch viele enzymatische Reaktionen in Aldosteron umgewandelt. Eine große Rolle spielen dabei die Cytochrom P450-Enzyme (CYP), welche eine Hämgruppe enthalten. Als Coenzym, welches Elektronen auf die CYP450-Enzyme überträgt, dient Adrenodoxin. Aus Cholesterin entsteht so Pregnenolon, aus Pregnenolon wird durch eine Hydroxysteroiddehydrogenase Progesteron gebildet, und aus Progesteron entsteht am glatten endoplasmatischen Retikulum 11-Desoxicorticosteron. Aus 11-

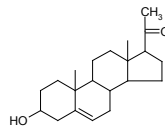
Desoxicorticosteron wird durch Hydroxylierung Corticosteron gebildet, aus Corticosteron wiederum entsteht über 18-Hydroxycorticosteron Aldosteron. Die letzten beiden Schritte werden nur durch die Aldosteronsynthase CYP11B2, die sich an der inneren Mitochondrienmembran befindet, bewerkstelligt und finden im Gegensatz zu den anderen Schritten nur in den Zona glomerulosa Zellen statt (7).

## StAR

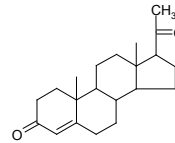
↓ (Transport an die innere Mitochondrienmembran)

**Cholesterin**

↓ *Cholesterin-Desmolase (CYP11A1)*

**Pregnenolon**

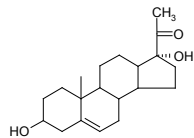
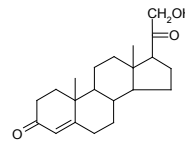
→

**Progesteron**

↓ *P450c17 (CYP17)*

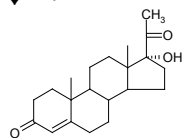
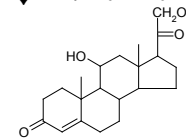
*3β-HSD2*

↓ *21α-Hydroxylase (CYP21)*

**17α-Hydroxypregnenolon****11-Desoxycorticosteron**

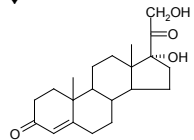
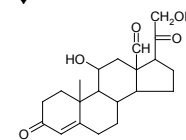
↓ *3β-HSD*

↓ *11β-Hydroxylase (CYP11B1)*

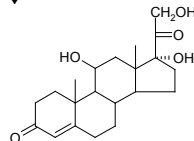
**17α-Hydroxyprogesteron****Corticosteron**

↓ *21α-Hydroxylase (CYP21)*

↓ *Aldosteronsynthase (CYP11B2)*

**11-Desoxycortisol****Aldosteron**

↓ *11β-Hydroxylase (CYP11B1)*

**Cortisol****Abbildung 4: Die Syntheseschritte von Cholesterin zu Aldosteron und Cortisol beim Menschen.**

Die Ausgangssubstanz Cholesterin wird durch das StAR-Protein (steroidogenic acute regulatory protein) von der äußeren an die innere Mitochondrienmembran transportiert. Von dort können die enzymatischen Schritte zur Synthese von Aldosteron und Cortisol beginnen. In den Mitochondrien der Nebennierenrindenzellen wird durch das Enzym CYP11A1 Cholesterin in Pregnenolon umgewandelt. Im endoplasmatischen Retikulum wird aus diesem durch die 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase2 (3β-HSD2) und CYP17 Progesteron und 17-OH-Progesteron gebildet. Durch das CYP21A-Enzym wird anschließend 11-Desoxycorticosteron bzw. 11-Desoxycortisol synthetisiert. Anschließend wandelt CYP11B1 11-Desoxycorticosteron bzw. 11-Desoxycortisol in Corticosteron bzw. Cortisol um. Die Cortisolsynthese ist hiermit beendet. Zur Aldosteronsynthese sind weitere Schritte nötig. In den Zellen der Zona glomerulosa entsteht durch das Enzym CYP11B2 aus 11-Desoxycorticosteron über 18-OH-Corticosteron Aldosteron. Da adulte Mäuse das Enzym CYP17 nicht exprimieren, können sie kein Cortisol synthetisieren, stattdessen produzieren sie als Glukokortikoid Corticosteron.



Wichtig zu erwähnen ist, dass die Mineralokortikoidrezeptoren nicht nur Aldosteronmoleküle, sondern auch Glucocorticoide, die in 1000-fach höheren Konzentrationen im Plasma vorliegen, binden. Um dennoch eine spezifische Bindung von Aldosteron zu gewährleisten, wird an den Rezeptor gebundenes Cortisol durch die 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-2 zu Cortison oxidiert und somit inaktiviert. Cortison hat eine wesentlich geringere Affinität zum Mineralokortikoidrezeptor als Aldosteron, sodass in Zellen mit aktiver 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-2 Glukokortikoide keine mineralokortikoide Wirkung entfalten können. Dieser Vorgang kann durch das reduzierende Enzym 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-1, welche inaktives Cortison in aktives Cortisol umwandelt, rückgängig gemacht werden. So kann über die Anwesenheit des einen oder des anderen Enzyms in den Zielzellen darüber entschieden werden, welche Wirkung sich entfalten soll (7) („Biochemie“, Rassow, 2. Auflage, Duale Reihe, Thieme, S. 620). An dieser Stelle ist es außerdem wichtig zu erwähnen, dass Mäuse kein Cortisol produzieren, da sie das Enzym 17-Hydroxylase nicht besitzen (19). Stattdessen bilden sie als Glukokortikoid Corticosteron.

Effektorzellen von Aldosteron sind v.a. im Sammelrohr der Niere, im Darm, im Schweißdrüsengang und in Speicheldrüsen zu finden. Hat das Aldosteron seine Zielzelle erreicht, diffundiert das lipophile Hormon durch die Zellmembran und bindet im Cytosol an den Mineralokortikoidrezeptor. Die hormonbindenden Rezeptoren dimerisieren und translozieren in den Zellkern, wo sie mit ihren Zinkfingern an palindromische (gleiche Basenabfolge auf beiden Strängen) Sequenzen der DNA binden und die Transkription von Aldosteron-regulierten Genen, z.B. der SGK1, in Gang bringen. Die SGK1 vermindert die Degradation von ENaC und ROMK1 Kanälen in Sammelrohrzellen. Über den luminalen ENaC-Kanal werden vermehrt Na<sup>+</sup>-Ionen in die Zellen aufgenommen und basolateral durch die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase an die Blutbahn abgegeben. Die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase sorgt aber auch dafür, dass Kaliumionen über die basolaterale Membran in die Zelle eingeschleust werden. Von dort verlassen sie über den luminalen ROMK-Kanal die Zelle und gelangen in das Lumen des Sammelrohrs und werden dann über den Urin ausgeschieden. Außerdem stellt das durch den Natriumeinstrom depolarisierte Membranpotential eine treibende Kraft für die Sekretion der positiv geladenen Kaliumionen dar. Durch diese Mechanismen können Natrium und

Wasser in die Blutbahn aufgenommen werden und zur Erhöhung des Blutdruckes beitragen, während Kalium mit dem Harn oder den Faeces ausgeschieden wird (7)(„Biochemie“, Rasso, 2. Auflage, Duale Reihe, Thieme, S. 620).

#### 1.4. Für diese Arbeit wichtige Kalium-Kanäle

---

Das Membranpotential der Zona glomerulosa Zellen ist mit -80 mV deutlich negativer als in den meisten anderen Körperzellen und liegt dem Kaliumgleichgewicht sehr nahe. Dies spricht dafür, dass in diesen Zellen das Ruhemembranpotential maßgeblich durch die hohe Kaliumleitfähigkeit bestimmt wird. Es gibt mehrere Arten von Kaliumkanälen; dazu gehören die spannungsabhängigen ( $K_v$ ), die Kalziumabhängigen ( $K_{Ca^{2+}}$ ), die einwärtsgerichteten ( $K_{ir}$ ), ATP-abhängigen ( $K_{ATP}$ ), G-Protein-abhängigen ( $K_{Gprot}$ ) und die two-pore domain (K2P) Kanäle. Die K2P Kanäle bestehen aus 300-500 Aminosäuren, sie besitzen 4 Transmembrandomänen und 2 Poren-bildende Domänen (20). Zwei dieser Kanalproteine dimerisieren zu einem funktionellen Kanal. Zu der K2P-Familie gehören die Kanäle TWIK (Two pore domain Weak Inward rectifying  $K^+$  channel), TREK1 (TWIK related  $K^+$  channel), TRAAK (TWIK related arachidonic acid stimulated  $K^+$  channel), TALK, THIK, TRESK und TASK (TWIK related acid sensitive  $K^+$  channel) (20). Alle in dieser Arbeit beschriebenen Kanäle dienen dem Kaliumausstrom, mit dem sie das negative Ruhemembranpotential der Zelle stabilisieren. Sie kommen bei Säugetieren in vielen verschiedenen Geweben vor. Während der KCNQ1- und maxiK-Kanal durch Depolarisation bzw. durch Kalzium aktiviert werden, gehören die K2P-Kanäle zu den Leckkanälen. Diese sind spannungsunabhängig geöffnet und tragen zur Hintergrundleitfähigkeit bei. Besonders wichtig für die Regulation der Aldosteronsynthese sind die Kanäle TASK und TREK. Sie bestimmen die Stimulierbarkeit der Zelle und können, indem sie durch Ang II gehemmt werden, eine Depolarisation und somit die Aldosteronsekretion begünstigen (9;21). Der maxiK (Gencode der porenbildenden Untereinheit: KCNMA1) wird durch Kalzium aktiviert. Dadurch spielt er bei der Repolarisation nach erfolgter Depolarisation mit intrazellulärem Kalziumanstieg eine wichtige Rolle. Auch er findet sich in der Zona

glomerulosa und ist für die Regulation des Kaliumhaushaltes, der Aldosteronsekretion und des Blutdruckes wichtig.

#### 1.4.1. TASK-Kanäle

---

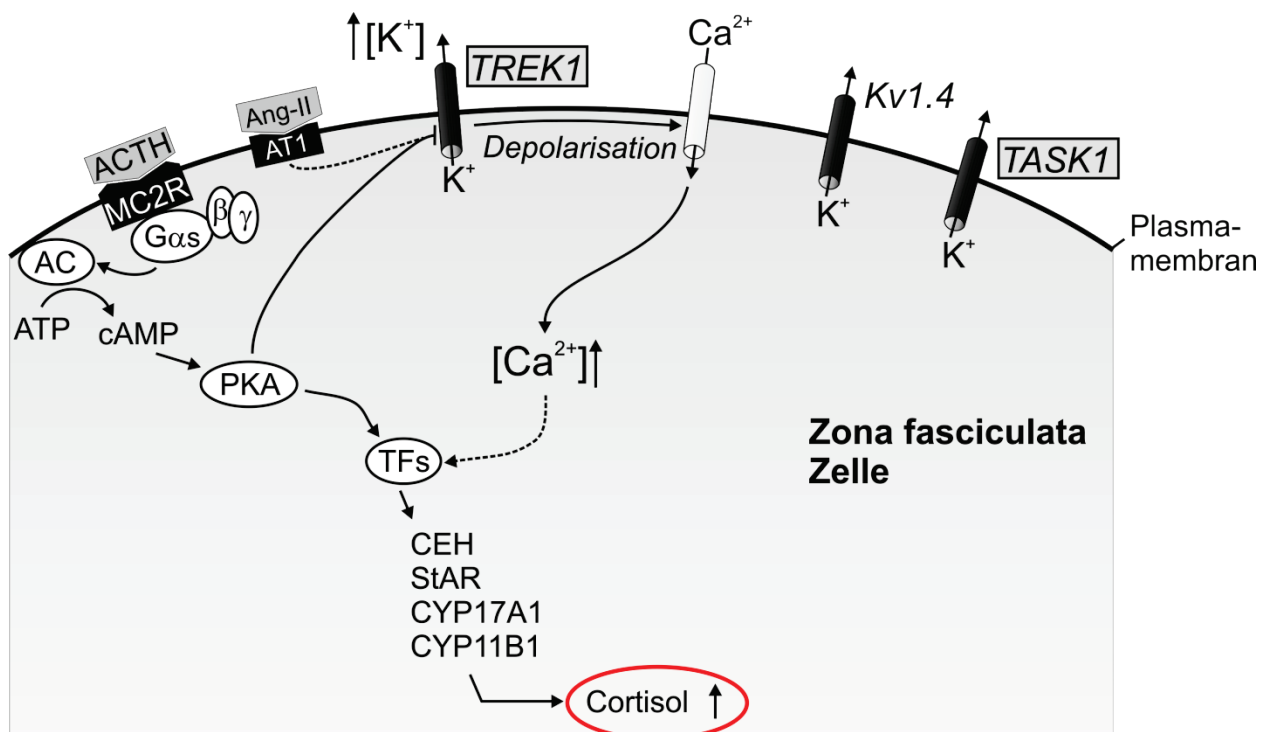
Es gibt 5 verschiedene TASK-Kanäle, von denen TASK2 und TASK4 neuerdings der TALK-Familie zugeordnet werden. TASK5 besitzt keine bekannte Funktion. Zu den Wirkungen der TASK-Kanäle gehören Neuroprotektion, zerebrovaskuläre Dilatation, Regulierung der Aldosteronsekretion, Chemorezeption im Glomus Caroticum, pulmonale Vasokonstriktion und die Entstehung von Depression (22;23). Es wurde beobachtet, dass die TASK-Kanäle bei Senkung des extrazellulären pH-Wertes gehemmt werden. Bei dem TASK1-Kanal z.B. konnte bei einem pH von 7,7 90% des maximalen Stroms gemessen werden. Bei einem pH von 6,3 beträgt dieser nur noch 10% (24). Der Kanal ist also v.a. im physiologischen pH-Bereich reguliert. Abhängig vom Membranpotential und vom Ionengradienten kommt es entlang der Zellmembran durch den Kaliumkanal zu einem Kaliumstrom. Sowohl ein niedriger pH-Wert als auch Ang II bewirken durch eine Hemmung der TASK-Kanäle über eine Depolarisation die Aldosteronausschüttung (25). TASK1 und TASK3 z.B. tragen zur Hintergrundleitfähigkeit in Glomerulosazellen bei und können durch Ang II gehemmt werden (22). Bei einer Änderung des pH-Wertes verändert sich die Anzahl aktiver Kanäle, nicht die Einzelleitfähigkeit. Außerdem vermindert eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration die pH-Sensitivität (26). TASK1 & TASK3 sind eng mit einander verwandt, ihre Aminosäureprimärsequenzen sind zu 54% identisch. Sie sind außerdem zwei Kanäle der K2P-Familie, von denen bekannt ist, dass sie Heterodimere bilden können.

#### 1.4.2. TREK-Kanäle

---

TREK-kanäle sind ebenfalls Leckkanäle, die Kalium aus der Zelle heraus leiten und dadurch das Ruhemembranpotential stabilisieren. Der TREK-Kanal wurde bis jetzt v.a. in bovinen Nebennieren untersucht, ist aber auch in der Zona fasciculata humaner

Nebennieren vorhanden (27). Er ist der hauptverantwortliche Kanal für die Hintergrundleitfähigkeit von bovinen Zona glomerulosa und Zona fasciculata Zellen (12;28;29). Ang II und ACTH hemmen TREK1 Kanäle und bewirken so eine Depolarisation der Zelle (9;30;31). Die anschließende Aktivierung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen bewirkt einen Kalziuminflux, welcher zu einer Aldosteronausschüttung führt. Somit ist der TREK1-Kanal für die Kopplung zwischen Ang II und der Aldosteronsekretion ebenfalls ein wichtiger Faktor. Außerdem konnten Enyeart et al. (28) zeigen, dass Substanzen, die den TREK1-Kanal aktivieren (Arachidonsäure, ATP, Azidität, CDC), zu einer Hyperpolarisation führen. So lässt sich schlussfolgern, das TREK1 zumindest in der bovinen Nebennierenrinde eine wichtige Funktion bei der Regulation der Aldosteronsekretion inne hat.



**Abbildung 5: Regulation von TREK1.**

Durch Bindung von ACTH an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor der Zona fasciculata Zelle kommt es über die Untereinheit  $G_{\alpha s}$  zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) mit folgender Entstehung von cAMP. cAMP wiederum aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche die TREK1-Kanäle hemmt und somit eine Depolarisation begünstigt. Durch Depolarisation werden Kalziumkanäle aktiviert, sodass es zu einem Kalziumeinstrom in das Zellinnere kommt. Über weitere Signalwege kommt es letztendlich zu einer Transkriptionssteigerung von StAR sowie CYP11B1, welche in der Zona fasciculata die Cortisol synthese initiieren. TFs: Transkriptionsfaktoren, CEH: Cholesterolesterhydrolyase. Modifiziert nach (14).

### 1.4.3. KCNQ1-Kanäle und ihre Untereinheiten

---

Auch der KCNQ1-Kanal wurde in dieser Arbeit untersucht. Er ist im Gegensatz zu den bis jetzt erwähnten Kanälen ein spannungsabhängiger Kanal ( $K_V$ ). Der 1996 von Wang et al. entdeckte Kanal ist, zusammen mit der  $\beta$ -Untereinheit KCNE1, am Herzen für den langsamen gleichrichtenden Strom (delayed rectifier current I<sub>Ks</sub>) verantwortlich. Er dient der Repolarisation des Herzmuskels. Außerdem ist er für den Elektrolyttransport in epithelialen Geweben wichtig. Der Kanal besitzt 6 Transmembrandomänen und eine Porenregion (32). Es sind 6 verschiedene Splicevarianten bekannt (33). Der KCNQ1-Kanal wird durch zunehmende Depolarisation langsam aktiviert und leitet anschließend Kaliumionen aus der Zelle hinaus. Die Eigenschaften des KCNQ1-Stroms werden durch die KCNE- $\beta$ -Untereinheiten, die eine Transmembrandomäne besitzen, bestimmt. Die KCNE1-Untereinheit z.B. bewirkt eine Zunahme des KCNQ1-Stroms mit einem Anheben der Aktivierungsschwelle in positivere Membranpotentialbereiche (ca -20 mV)(33;34). Außerdem bewirkt er eine verlangsamte Aktivierung und Deaktivierung und eine nahezu fehlende Inaktivierung (32). Die Untereinheit KCNE1 spielt eine große Rolle für die Herzaktion. Die Untereinheit KCNE2 hingegen scheint den KCNQ1-Kanal konstitutiv zu aktivieren und so eventuell zum Ruhemembranpotential beizutragen (35). Mutationen in KCNE2 sowie in KCNE1 und KCNQ1 selbst sind mit dem Long-QT-Syndrom assoziiert, welches zu Torsades-de-pointes-Tachykardien, Kammerflimmern und Herztod führen kann (36). Ist KCNQ1 mit KCNE3 assoziiert, ergibt sich eine nahezu lineare Strom-Spannungskurve und sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung geschehen rascher (37). KCNE4 scheint in physiologischen Spannungsbereichen den KCNQ1-Strom zu hemmen, ab 50 mV wird dieser langsam aktiviert (38;39). KCNE4 kommt v.a. im Herzen vor, wo er eventuell zur Feineinstellung der Herzaktion beiträgt. Auch KCNE5 bewirkt erst ab Spannungen von 40 mV einen KCNQ1-Strom. Diese Untereinheit wurde bei Mausembryonen und in humanen Gehirn-, Skelettmuskel- und Herzgeweben gefunden (40). Laut „biogps.org“ ist KCNE5 auch in der Nebenniere der Maus zu finden. *Kcnq1*<sup>-/-</sup> Mäuse besaßen eine niedrigere Plasmaaldosteronkonzentration unter Normaldiät, zeigten jedoch eine adäquate Anpassung bei hoch-Kaliumdiät (41). Experimente an *Kcne1*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten einen

Hyperaldosteronismus unter Normalbedingungen mit Verschlechterung unter hochkaliumdiät (42). Diese Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit dieses Kanals im Zusammenspiel mit seinen Untereinheiten für die Regulation der Aldosteronsynthese. Außerdem ist KCNQ1 besonders interessant, da er auch in der Nebenniere des Menschen stark exprimiert ist (42;43).

#### 1.4.4. maxiK/KCNMA1-Kanal

---

Der maxiK-Kanal wird durch das Gen KCNMA1 kodiert. Er ist sowohl Kalzium-aktiviert als auch spannungsabhängig. Ein Tetramer aus maxiK- $\alpha$ -Untereinheiten bildet einen funktionellen Kanal. Hinzukommen können regulatorische  $\beta$ -Untereinheiten, aber auch die eigenen Splicevarianten dienen der molekularen und funktionellen Vielfalt. Er dient ebenfalls dem Transport von Kaliumionen entlang des chemischen Gradienten aus der Zelle hinaus. Die Menge an exprimierten maxiK-Kanälen wird durch Hormone kontrolliert. So erhöhen ACTH, Testosteron und Progesteron die Anzahl der Kanäle; Glukokortikoide und Östrogene vermindern sie (44-46). Auf intrazellulärer Ebene wird maxiK durch die PKA reguliert. Neben dem TREK1-Kanal wird auch diesem Kanal eine neuroprotektive Wirkung nach einem Schlaganfall zugeschrieben. MaxiK ist wichtig für die Neurotransmission, den Blutfluss, das Immunsystem und die Uresis (47). Die Analyse der *Kcnma1*<sup>-/-</sup> Maus zeigte einen Hyperaldosteronismus und einen erhöhten mittleren arteriellen Blutdruck. MaxiK ist v.a. in der Zona glomerulosa vorhanden und sorgt ebenfalls für den Kaliumausstrom. Der erhöhte Blutdruck bei der knockout Maus ist jedoch nicht allein auf das erhöhte Aldosteron zurückzuführen. Auch bei der Relaxation der Gefäßmuskelzellen spielt der maxiK eine wichtige Rolle, sodass bei einem Verlust seiner Funktion die Vasodilatation gestört ist. Durch die verminderte Compliance erhöht sich der Blutdruck (48).

#### 1.4.5. KCNJ5

---

Der Kanal KCNJ5 wurde in dieser Arbeit zwar nicht näher untersucht, ist aber vermutlich wichtig für die Regulation der Aldosteronsekretion. Er gehört zu den einwärts gleichrichtenden Kaliumkanälen und ist in der Nebenniere v.a. in der Zona glomerulosa, zu geringen Anteilen auch in der äußersten Region der Zona fasciculata, zu finden (49;50). Unter Ruhebedingungen ist er inaktiv und wird durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren und intrazelluläres Natrium aktiviert (51;52). Dabei scheint eine Aktivierung von KCNJ5 die CYP11B2-Expression und Aldosteronproduktion zu hemmen während Angiotensin II die Expression von KCNJ5 vermindert (53). Weitere Studien haben ergeben, dass bestimmte Mutationen im KCNJ5-Gen zu einem Verlust der Kaliumselektivität führen (49;54). Es kommt zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit für Natrium, wodurch eine Depolarisation hervorgerufen wird, die wiederum über die Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle zu einer erhöhten Aldosteronausschüttung führt. Es entsteht ein Hyperaldosteronismus mit einer erhöhten Zellproliferation und einem arteriellen Hypertonus (49;55). Während die Keimbahnmutationen eher zu einer bilateralen Hyperplasie führen (da sie in jeder Zelle vorhanden sind), sind die erworbenen somatischen Mutationen für die Entwicklung von Adenomen verantwortlich. Ca. 40% der Aldosteron-produzierenden Adenome sind von diesen Mutationen im KCNJ5-Gen betroffen (56). Laut Monticone et al. (50) sind von diesen in Adenomen gefundenen Mutationen v.a. Frauen betroffen. In manchen Studien war die KCNJ5-mRNA-Expression im Adenomgewebe signifikant höher als in normalen Nebennieren (bei Monticone et al. (50) bis zu 4-fach erhöht). In Adenomen mit KCNJ5 Mutationen fanden sich außerdem erhöhte CYP11B2- (Aldosteronsynthase) und erniedrigte Plasmakaliumwerte (50). Diese Mutationen führen auch *in vitro* in mit KCNJ5-Mutanten transfizierten Zellen zu einer erhöhten Aldosteronproduktion (50). Die mutierten KCNJ5-Kanäle können durch Blocker von Natriumtransportern und Kalziumkanälen wie Amilorid und Verapamil gehemmt werden (57). Obwohl nicht alle KCNJ5-Mutanten in gleicher Weise durch Verapamil hemmbar sind, wäre es denkbar, dass diese Pharmaka eine medikamentöse Behandlungsstrategie für Patienten mit durch KCNJ5-Mutationen bedingten Adenomen bieten.

## 1.5. Pathophysiologie: Aldosteron und Bluthochdruck

---

Aldosteron wirkt an Darm, Niere, Schweißdrüsen und Speicheldrüsen sowie am Herz, im Gehirn und direkt an Blutgefäßen. Im Gehirn ist Aldosteron direkt an der zentralen Regelung des Blutdruckes, des Salzappetits und Durstes beteiligt. Durch seine lipophilen Eigenschaften kann es die Blut-Hirn-Schranke relativ leicht passieren. Jedoch sind die Mineralokortikoidrezeptoren nur in bestimmten Teilen des Gehirns wie Hippocampus, Septum und Kleinhirn vorhanden und das Enzym 11 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase-2 deutlich weniger mit diesen Rezeptoren assoziiert. Dadurch sind vermutlich die meisten Rezeptoren mit Glukokortikoiden besetzt. Außerdem wurde beobachtet, dass Aldosteron nicht nur in der Nebennierenrinde sondern auch im Gehirn und im Gefäßsystem produziert wird (58). Eine dortige autokrine oder parakrine Wirkung wird diskutiert.

Wie oben beschrieben, erhöht Aldosteron den Blutdruck. Ein erhöhter Blutdruck (auch arterielle Hypertonie genannt) ist ein weit verbreitetes medizinisches Problem, weswegen ein detailliertes Verständnis der Aldosteronfunktion sehr wichtig ist. Die arterielle Hypertonie ist definiert durch Blutdrücke  $\geq 140/90$  mmHg, die mindestens drei Mal an zwei verschiedenen Tagen gemessen wurden. In den Industrieländern leiden ca. 15-20% der Erwachsenen an einer arteriellen Hypertonie („Innere Medizin“. Classen, Diehl, Kochsiek. Urban und Fischer. 6. Auflage, 2009. S. 244), von denen nur 15-30% ausreichend behandelt werden („Innere Medizin“. Heiner Greten, Franz Rinninger, Tim Greten. 13. Auflage. 2010. S. 253). Die Prävalenz steigt mit höherem Alter und ist somit durch den demographischen Wandel und den wohlhabenden Lebensstil ein zunehmendes Problem in der westlichen Welt. Isoliert betrachtet, aber auch in Kombination mit anderen Faktoren wie Diabetes mellitus Typ II, Hypercholesterinämie, Rauchen und Nierenerkrankungen steigt das kardiovaskuläre Risiko und damit die Wahrscheinlichkeit eines Herzinfarktes erheblich. Weitere wichtige Folgeerkrankungen, die mit deutlich erhöhter Wahrscheinlichkeit auftreten, sind Erkrankungen des zerebralen Gefäßsystems, koronare Herzkrankheit, Durchblutungsstörungen,



chronische Herzinsuffizienz und chronisches Nierenversagen. Kardiovaskuläre Ereignisse sind die häufigste Todesursache in Deutschland. Aus diesem Grund ist es äußerst wichtig, der arteriellen Hypertonie ausreichend Beachtung zu schenken und deren Ursachen zu verstehen.

Es wird zwischen zwei Arten des Hypertonus unterschieden. In über 90% der Fälle handelt es sich um einen primären Hypertonus, dessen Ursachen meist unbekannt sind. Zu den Risikofaktoren gehören jedoch Vererbung, Ernährung, Übergewicht und psychischer Stress. Besonders wichtig zu erwähnen ist dabei die Kochsalzzufuhr (NaCl), die in den Industrienationen mit 10-15 g/Tag deutlich über dem minimalen Bedarf von 1 g/Tag liegt. Die Mehrzahl der Patienten mit Hypertonus profitiert von einer NaCl-Restriktion auf 4-6 g/Tag. Der alleinige Salzüberschuss kann für den Bluthochdruck jedoch nicht verantwortlich gemacht werden, es müssen auch genetische Prädispositionen vorliegen. Diese tragen mit ca. 50% zum Bluthochdruck bei und sind polygenetisch vererbt („Innere Medizin“. Classen, Diehl, Kochsiek. Urban und Fischer. 6. Auflage, 2009. S. 245). Fettreiche Kost und übermäßiger Alkoholkonsum können ebenfalls zu einer Erhöhung des Blutdruckes führen, während eine Kalium- und/oder Kalziumreiche Diät sowie Ausdauersport dieser vorbeugt.

Die sekundäre Hypertonie stellt mit bis zu 10% die seltenere Form dar und kann verschiedene Ursachen haben. Zu diesen zählen Nierenerkrankungen, endokrine Störungen, Medikamente und kardiovaskuläre Faktoren. Für diese Arbeit von großer Bedeutung ist der Hyperaldosteronismus, der häufiger vorkommt, als ursprünglich vermutet. Auf die anderen Formen der sekundären Hypertonie soll hier nicht weiter eingegangen werden. Auch der Hyperaldosteronismus wird in eine primäre und eine sekundäre Form eingeteilt. Der primäre Hyperaldosteronismus, auch Conn-Syndrom genannt, entsteht durch eine übermäßige autonome Produktion von Aldosteron in der Nebennierenrinde mit folglich erhöhtem Blutdruck und gestörtem Elektrolythaushalt. Der sekundäre Hyperaldosteronismus entsteht auf Grund einer erhöhten Reninproduktion durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Während also bei der sekundären Form sowohl das Renin als auch das Aldosteron im Blut erhöht sind, ist bei der primären Form das Renin auf Grund des negativen Feedbackmechanismus reaktiv

vermindert und nur das Aldosteron erhöht. Die Aldosteronkonzentration kann jedoch durch das reduzierte Renin basal auch normwertig sein. Bis zu 10% aller Patienten mit Bluthochdruck und ca. 20% (59) der Patienten mit therapieresistenter Hypertonie leiden an einem primären Hyperaldosteronismus (60-62)! In bis zu 75% der Hyperaldosteronismusfälle ist ein Aldosteron-produzierendes Adenom die Ursache (63). Aber auch Hyperplasien, Karzinome, glukokortikoidsensitiver Hyperaldosteronismus oder Cortisol-produzierende Tumoren können die Ursache sein („Innere Medizin“. Heiner Greten, Franz Rinninger, Tim Greten. 13. Auflage. 2010. S. 253). Bezüglich der weiteren Diagnostik bei Patienten mit Hypertonie und Hypokaliämie wird eine morgendliche Messung der Plasmarenin- und Aldosteronkonzentration empfohlen. Verdächtig sind eine niedrige Plasmareninaktivität oder eine nicht messbare Reninkonzentration sowie eine erhöhte Plasmaaldosteronkonzentration. Für die Diagnosestellung eines primären Hyperaldosteronismus ist sowohl eine erhöhte Plasmaaldosteronkonzentration als auch ein erhöhter Quotient aus Plasmaaldosteronkonzentration und Reninaktivität notwendig. Quotient-Werte zwischen 30 und 50 deuten auf einen primären Hyperaldosteronismus hin, während die Normwerte zwischen 4 und 10 liegen (cave: laborabhängig!) (<http://www.uptodate.com/contents/approach-to-the-patient-with-hypertension-and-hypokalemia?source=machineLearning&search=Hyperaldosteronismus&selectedTitle=1~105&sectionRank=1&anchor=H6#H6>). Die primäre Form des Hyperaldosteronismus führt zu einer klassischen Trias aus Bluthochdruck, Hypokaliämie und metabolischer Alkalose, wobei jedoch mehr als 50% der Patienten *keine* Hypokaliämie aufweisen. Diese ist maßgeblich von Ernährungsgewohnheiten abhängig. Neben den oben genannten Folgen des Bluthochdruckes kommen die Folgen der Hypokaliämie, die zu Muskelschwäche, Paresen, Obstipation bis hin zum Ileus, Herzrhythmusstörungen (Vorhofflimmern) und Polyurie führen können, hinzu. Am Herzen verursacht die Hypokaliämie eine verlängerte atrioventrikuläre Überleitungszeit, die zu Reentry-Phänomenen führen kann (64) und so Vorhofflimmern begünstigt. Auch die direkten Einflüsse des Aldosterons auf das Gefäßsystem führen über eine Verdickung der Tunica media und Versteifung zu erheblichen Compliancestörungen (65). Durch die geringere Dehnbarkeit der Gefäße sind die Scherkräfte vermindert und die davon

abhängige NO-Produktion gedrosselt, wodurch die regelrechte Vasodilatation ausbleibt. Dadurch erhöht sich zunehmend der Gefäßtonus und der Blutdruck steigt noch mehr an. Dazu kommt eine durch TNF- $\alpha$  vermittelte perivaskuläre Entzündung. Außerdem führt Aldosteron zu einer Fibrose (66;67) und Hypertrophie des Herzens, die von einer diastolischen Dysfunktion begleitet wird (68;69). Diese auch Remodelling genannten Veränderungen sind zunächst reversibel. So haben Aldosteronantagonisten eine wesentliche Rolle in der Therapie vieler Herzkreislauferkrankungen eingenommen. Die RALES-Studie beispielsweise konnte nachweisen, dass Aldosteronhemmer wie Spironolakton die Gesamtmortalität bei Herzinsuffizienz NYHA (New York Heart Association) Grad III & IV um 30% senken kann (70). Ein weiterer Aldosteronantagonist namens Eplerenon konnte in der EPHEBUS-Studie eine Reduktion der Gesamtmortalität um 8% erreichen, führte allerdings häufiger zu Hyperkaliämien (71). Die starke Wirkung der Aldosteronantagonisten beruht auch darauf, dass sie das Remodelling vermindern (72). Aufgrund der großen Relevanz für Herzkreislauferkrankungen und der hohen Sterblichkeit ist es wichtig, die genauere Pathogenese des Hyperaldosteronismus zu verstehen. Gegenstand dieser Arbeit war es, den Einfluss verschiedener Kaliumkanäle auf die Aldosteronproduktion zu untersuchen. Die genaue Zielsetzung wird im nächsten Abschnitt dargestellt.

### 1.6. Phänotyp der TASK-Kanal Knockout-Mäuse mit Schwerpunkt auf *Task1*<sup>-/-</sup>

Wie bereits erwähnt, sind diverse Kaliumkanäle für die Funktionen der Nebennierenrinde, insbesondere für die Aldosteronsynthese von essentieller Bedeutung. Man kann sich also vorstellen, dass ein Defekt oder eine Mutation dieser Kanäle auch bedeutende Veränderungen für die Funktion und Integrität der Nebennierenrinde nach sich zieht. Unsere Arbeitsgruppe hat herausgefunden, dass weibliche *Task1*<sup>-/-</sup> Mäuse (denen der Task1-Kanal fehlt) das Enzym Cyp11b2 in der Zona fasciculata anstatt wie sonst üblich in der Zona glomerulosa exprimieren (Maus mit „Dezonierung der Aldosteronsynthese“, im Folgenden als „dezoniert“ bezeichnet). Außerdem wurde bei diesen Mäusen ein primärer Hyperaldosteronismus gefunden. Der Hyperaldosteronismus schien unter Kontrolle des ACTH zu stehen – Behandlung mit

Dexamethason führte zu einer Normalisierung der Plasmaaldosteronlevel (9;11). Die erwachsenen *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen waren hingegen normal zoniert und zeigten normale Aldosteronspiegel; vor der Pubertät waren beide Geschlechter dezontiert. Außerdem entwickelten *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen nach Testosterongabe eine normale Zonierung und *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen, die kastriert wurden, entwickelten eine dezontierte Aldosteronsynthese. Folglich ergab sich die Vermutung, dass die Zonierung der Cyp11b2 von Androgenen abhängig ist. Als möglichen Kandidaten, der eine Kompensation der Task1-Deletion ermöglicht, vermutete man zunächst bei Männchen den Task3-Kanal, da er bei ihnen in deutlich größeren Mengen exprimiert wird als bei Weibchen und zusätzlich in der Zona fasciculata zu finden ist. Allerdings wurde festgestellt, dass Doppelknockoutmännchen *Task1*<sup>-/-</sup>/*Task3*<sup>-/-</sup> einen primären Hyperaldosteronismus besaßen, aber normal zoniert waren (73). Bei den *Task3*<sup>-/-</sup> Mäusen kam es unter Normaldiät zwar nicht zu einem Hyperaldosteronismus, aber zu einem 3-fach erhöhten Aldosteron-Renin-Quotienten, ein Marker für autonome Aldosteronproduktion. Unter hoch-Natrium- und niedrig-Kalium-Diät zeigte sich jedoch auch bei den *Task3*<sup>-/-</sup> Mäusen ein Hyperaldosteronismus. Als Konsequenz entwickelten die vom *Task3*-Knockout betroffenen Mäuse einen salz-sensitiven Hypertonus (8). Offensichtlich spielt Task3 für die Anpassung der Aldosteronproduktion an die Salzaufnahme eine Rolle. Guagliardo et al. fanden sogar schon unter Normaldiät einen Hyperaldosteronismus (im Urin gemessen) bei *Task3*<sup>-/-</sup> Mäusen (10). Folglich ist der Task3 Kanal neben dem Task1 Kanal von besonderer Bedeutung für die Regulation der Aldosteronsekretion.

## 2. Zielsetzung und Fragestellung

---

Ziel dieser Dissertation war es, den Phänotyp der *Task1*<sup>-/-</sup> Mäuse weiter zu charakterisieren. Im Rahmen der allgemeinen Phänotypisierung wurden Analysen zur Plasmaaldosteronkonzentration, der Lokalisation der Aldosteronsynthese innerhalb der Nebennierenrinde und der Expressionshöhe von Cyp11b1, Cyp11b2 sowie von verschiedenen Kaliumkanälen durchgeführt. Dazu gehörte u.a. speziell die Frage nach weiteren Kandidaten neben Task3, welche in männlichen Mäusen die Kompensation der *Task1*-Deletion ermöglichen könnten. Zu diesem Zweck wurde die mRNA-Expression verschiedener K<sup>+</sup>-Kanäle, die zur Kompensation beitragen könnten, mittels Realtime-PCR im Hinblick auf geschlechtsspezifische Unterschiede quantifiziert. Dazu wurden zusätzlich Daten von Dr. David Penton-Ribas mit kastrierten Männchen und Testosterongaben hinzugezogen, um die androgenabhängige Expression verschiedener Kaliumkanäle zu ermitteln. Anschließend wurden die Kaliumkanalexpressionen von wildtyp und *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen. Mittels weiterer Techniken (Western-Blot, Immunfluoreszenzfärbung) sollte der Zusammenhang zwischen Genexpression und Hyperaldosteronismus sowie Dezonierung der Aldosteronsyntheseexpression untersucht werden.

Speziell die Rolle von Kcnq1 wurde näher untersucht. Dazu wurden in vivo Versuche an männlichen wildtyp Mäusen durchgeführt. Diese bekamen zu festgelegten Zeiten verschiedene Substanzen injiziert. Anschließend wurde die Aldosteronkonzentration bestimmt. Dies sollte Hinweise auf die Auswirkung einer pharmakologischen Hemmung des Kcnq1-Kanals im Hinblick auf die Aldosteronproduktion geben und dadurch die Funktion dieses Kanals weiter aufdecken.

Diese Arbeit könnte dazu dienen, die Funktion und das Zusammenspiel der einzelnen Kaliumkanäle in der Nebennierenrinde weiter aufzudecken und das Verständnis für die Entwicklung eines primären Hyperaldosteronismus oder einer Dezonierung der Aldosteronsynthese zu verbessern.

### 3. Material und Methoden

---

#### 3.1. Material

---

##### 3.1.1. Geräte

---

Gerät	Hersteller
Autoklav	Tuttnauer 2540ELC, biomedis GmbH, Gießen, D
Brutschrank	Heraeus Instruments, Osteode, D
Chirurgische Instrumente	A.Dumont & Fils, Switzerland FST, Bad Oeynhausen, D
Fluoreszenz-Imagingsystem (Filterradbasiert)	Molecular Devices Corporation, Downingtown, PA, USA
Gasflasche	5 vol% CO <sub>2</sub> auf O <sub>2</sub> , Linde gas therapeutics GmbH & Co. KG, Unterschleißheim, D
Gasmischanlage für Isofluran Verdampfer	MFI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, D
Gelkammer	Mini 440.000, Harnischmacher, Schauenburg, D
Hämatokrit-Zentrifuge	Biofuge haemo, Heraeus Instruments, Osteode, D
Heizer	Haake Fisons D8
Invertmikroskop	Axiovert 200, Zeiss, Jena, D
Isofluran Verdampfer	Vapor 19.3, Drägerwerk AG, Lübeck, D
Kryostat	Leica CM3050 S, Wetzlar, D
Light-Cycler® 480 Real-Time PCR Instrument	Für multiwell plates, Roche, Mannheim, D
Metamorph V6.2r2 (Software für Fluoreszenzmikroskop)	Molecular Devices Corporation, Downingtown, PA, USA
Mikroskop	Stemi SV6, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Mikrotiterplatten-Photometer	TECAN Sunrise, Tecan Trading AG, CH
Mikrotiterplatten-Zentrifuge	Z300, Hermle, Wehningen, D
Pumpe	Ismatek Reglo, Wertheim-Mondfeld, D
Setup für Nebenniereninkubation	Erstellt von David Penton
Spritzen für das Setup	BD Micro-Fine, BD Consumer Healthcare, Heidelberg, D
Thermocycler T1	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, D
Thermomixer	Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge	Mikro 20, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
UV-Photospektrometer	Genova, Jenway, Essex, E
Wasserbad	WB6, PD-Prüfgeräte, Preiss-Daimler, Burladingen, D

### 3.1.2. Verbrauchsmaterial

---

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Blotting-Papier (Chromatographie Papier 3mm ) Whatmann	Whatmann GmbH, Dassel, D
Deckgläser	24 x 50 mm, A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Glycergel mounting medium	Dako, Hamburg, D
heparinisierte Mikro-Hämatokrit-Kapillaren	Brand GmbH CO KG, Wertheim, D
Insulinspritzen	U-100, 0,5 ml, BD Micro-Fine +, Heidelberg, D
Kulturschälchen (klein)	EASY GRIP Tissue Culture Dish, sterile, Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, F
Latex-Handschuhe	Rotiprotekt-Latex, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Nitril-Handschuhe	Rotiprotekt-Nitril, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Medical X-ray film	Fotochemische Werke GmbH, Berlin, D
Mikrotiterplatten	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
MilliQ Wasser	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Nitrocellulose-Membran	Amersham Bioscience, Freiburg, D
Pasteurpipetten	150 mm, Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, D
PE-Schläuch (Katheter)	Benno Kummer, Freiburg, D
Petrischalen	Nuclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Polysin Objektträger	Kindler, Freiburg, D
Schreddersäule	QIAshredder™ (50), Qiagen GmbH, Hilden, D

### 3.1.3. Chemikalien, Arzneimittel, Hormone

---

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe, D
Agarose	AppliChem, Darmstadt, D
Angiotensin II (Ang II)	Sigma, Taufkirchen, D
BSA (Albumin from bovine serum)	Sigma, Taufkirchen, D
CaCl <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D
DMEM Medium	DMEM 31885 Gibco (low glucose), Invitrogen, Darmstadt, D
EDTA	Sigma, Taufkirchen, D
Ethanol	J. T. Baker, Deventer, NL
Albumin, bovine fraction V solution 7,5%	Sigma, Steinheim, D
Glucose	Merck, Darmstadt, D

Heparin-Lösung	Liquemin N 25000, 5 ml, Roche, Mannheim, D
HEPES	AppliChem, Darmstadt, D
HMR 10 <sup>-1</sup> M	HMR 1556, Aventis, Frankfurt, D
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
isotone Natriumchloridlösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
KCl	Merck, Darmstadt, D
Lipofektamin	Lipofectamine 2000 Reagent, Invitrogen, Darmstadt, D
Mäusefutter	SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, D
MEM alpha medium	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, D
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, D
Opti-MEM	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Paraffinöl	Acros Organics, Geel, Belgien
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
PMSF	Sigma, Taufkirchen, D
Protease-Inhibitor-Cocktail	Calbiochem Set III, Nottingham, UK
Proteinase K	100 mg/ml
SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz)	Merck, Darmstadt, D
Sephadex	Sephadex G-50, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Synacthen Injektionssuspension	1 mg/ml Depot, Sigma-tau Arzneimittel GmbH, Düsseldorf, D
TEMED	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen, D
Tris HCL	Sigma, Taufkirchen, D
Trypsin-EDTA-Lösung (10x), Flüssig	0,5% Trypsin / 5,3 mM EDTA, Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Plasmid pCI mit mKCNQ1-Insert	von AG Jacques Barhanin
Plasmid pEGFP-N1 mit XPB-Insert	Clontech Laboratories, Mountain View, CA

### 3.1.4. Kits/Enzyme

Produkt	Hersteller
Bradford-basierter Protein-Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Aldosteron ELISA	Dbc-Diagnostics Biochem Canada Inc., Emergo Europe, Den Haag, NL



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
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	Eurobio, Les Ulis Cedex B, F
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, Wisconsin, USA
M-MLV Reverse Transkriptase Puffer (5x)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
PCR Buffer 10x	Eurobio, Les Ulis Cedex B, F
Random Hexamer Primer (100 µM)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
RNase Inhibitor	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, D
RNeasy Mikro kit (50)	Quiagen, Hilden, D
SYBR® Green PCR Kit	Quiagen, Hilden, D
Taq-Polymerase	Eurobio, Les Ulis Cedex B, F
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, D

### 3.1.5. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Invitrogen, Karlsruhe, D hergestellt.

Gen	sense/antisense	Primersequenz 5'→3'	Verwendete Annealing-Temperatur	Amplikongröße
<b>Primer für Realtime PCR</b>				
Kcnq1	sense	tcattcaccgccaggagc	56° C	143 bp
	antisense	cagagcatctgcgtagctg		
m-β-Actin	sense	gacaggatgcagaaggagattactg	56° C	98 bp
	antisense	ccaccgatccacacagagtactt		
mTask3	sense	acatcagctccgatgactacc	56° C	147 bp
	antisense	cagggtcagcatgtccata		
mTrek1	sense	tcactgggacctcggaag	56° C	92 bp
	antisense	tccaccttcagttcgtgg		
mCyp11b2 full2	sense	catctctgagatgccaacag	56° C	82 bp
	antisense	aatgccactgtaggctgag		
mCyp11b2 short1	sense	tacactatagaagccaacagatg	56° C	103 bp
	antisense	cctgagatattagttccgcc		
mTask2	sense	caatgattttgctgccaca	60° C	60 bp
	antisense	tctgggagccacattgc		
mCyp11b1	sense	aatggaactcattgctggaag	60° C	121 bp
	antisense	ctcagctgccaggctctc		
mKcnma1 (maxiK)	sense	cgtcacagatcccaaaagaat	60° C	68 bp
	antisense	ttctctgtagatggacatcttg		
mKcne1	sense	actgcctgggaactcaga	59°C	140 bp
	antisense	cctgatgcagagcaaaactct		
mKcne2	sense	tgcatgctcacataccaca	59°C	124 bp
	antisense	gtgtcctcctccagctgtc		
mKcne3	sense	gggcattattgcagtggtca	56°C	71 bp
	antisense	aagttccaggatggacgtg		
mKcne4	sense	cacttgggacaaaactgtcagc	56°C	91 bp

	antisense	gctgggggatgtgctgttc		
mKcne5	sense antisense	tgagaggtcagaaccctcaa gtggtcgggtgtgagtaagg	59°C	68 bp
<b>Primer für PCR</b>				
mβ-Aktin (cDNA-Kontrolle von NN21, 22)	sense	gacaggatgcagaaggagattactg	9° C	98 bp
	antisense	ccaccgatccacacagagtactt		
β-Aktin (cDNA-Kontrolle NN1, 20, 23, 24)	sense	tgacggggtcaccacactgtgccat cta	62° C	661 bp
	antisense	ctagaagcatttgcggtggacgatgga ggg		
<b>Genotypisierung- primer</b>				
mKcnq1	antisense	gccagcactaaagatcttgc	52° C	
mKcnq1 (wt Allel)	sense	ccaggagtgggtggttctac		278 bp
Neo Kcnq1 ko (ko Allel)	sense	cgcttcctcgtgctttacg		370 bp

### 3.1.6. Antikörper/Fluoreszenzfarbstoffe

Bezeichnung	Art	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
<b>Primärantikörper</b>			
Anti-Cyp11b2 rabbit	Primär-Antikörper	1:100	AG Gomez (neu) (74)
Anti-Dab2 rabbit	Primär-Antikörper	1:100	Santa Cruz, Heidelberg, D
Anti-Kcnq1 H130 rabbit	Primär-Antikörper	1:250/ 1:100	Santa Cruz, Heidelberg, D
Anti-Task3 rabbit	Primär-Antikörper	1:100	Alomone, München, D
Anti-Kcnq1 rabbit	Primär-Antikörper	1:500	Prof. Dr. Dr. Thomas J. Jentsch, MDC, Berlin-Buch, D
Anti-Kcnma1 rabbit	Primär-Antikörper	1:500	Alomone labs (APC-021, Lot AN-08), Jerusalem, Israel.
Anti-Kcnq1 C20 rabbit	Primär-Antikörper	1:250 (WB)	Santa Cruz, Heidelberg, D
<b>Sekundärantikörper</b>			
Cy2 donkey anti sheep	Sekundär-Antikörper	1:400	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, E
Alexa 488 donkey anti rabbit	Sekundär-Antikörper	1:400	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa 546 donkey anti goat	Sekundär-Antikörper	1:400	Invitrogen, Karlsruhe, D

HOE33342 (Stockkonz.: 5x10 <sup>-4</sup> )	Zellkernmarker	1:400	Invitrogen, Karlsruhe, D
Cy3 goat anti rabbit	Sekundär-Antikörper	1:400	Jackson Immunoresearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, E
HRP-goat anti rabbit IgG, polykonal	Sekundär-Antikörper, für Westernblot	1:7500	Santa Cruz, Heidelberg, D

### 3.1.7. Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Endkonzentration
<b>Fixierlösung I, pH 7,4</b>	EGTA	1 mM
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15 mM
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM
	NaCl	90 mM
	Paraformaldehyd	3%
	Saccharose	3,4%
	Aqua dest.	
<b>Fixierlösung II, pH 7,4</b>	EGTA	0,33 mM
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 mM
	MgCl <sub>2</sub>	0,67 mM
	NaCl	30 mM
	Paraformaldehyd	1 %
	Saccharose in Aqua dest.	17 %
<b>PBS-Puffer, pH 7,4</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,3 mM
	NaCl	137 mM
	in Aqua dest.	
<b>RIPA-Auflösung-Puffer, pH 7,4</b>	SDS	0,1%
	Igepal	1%
	Natriumdesoxycholat	0,5%
	Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, 100x stock)	1x
	PMSF	1 mM
	in PBS	
<b>SDS-PAGE Trenngel (8%)</b>	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.	
<b>SDS-PAGE-Sammelgel</b>	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.	
<b>SDS-PAGE Laufpuffer 5x, pH 8,3</b>	TRIS	124 mM
	Glycin	0,959 M
	SDS	17,3 mM
	in Aqua dest.	
<b>Transfer-Puffer für WB</b>	Methanol	200 mL
	5x SDS-PAGE Laufpuffer auf 1L mit Aqua dest.	200 mL
<b>Block-Lösung, pH 7,4 (für WB)</b>	Trockenmilchpulver	5%
	Tween-20	0,1%
	in PBS	
<b>Wasch-Lösung, pH 7,4 (für WB)</b>	Tween-20	0,1%
	in PBS	
<b>Antikörper- Verdünnungslösung, pH 7,4 (für Sekundär-AK im WB)</b>	Trockenmilchpulver	1%
	Tween-20	0,1%
	in PBS	
<b>Antikörper- Verdünnungslösung, pH 7,4 (Primär-AK im WB)</b>	BSA	1,5%
	Tween-20	0,1%
	NaN3	0,01%
	in PBS	
<b>Block-Lösung, pH 7,4 (für IF)</b>	BSA	5%
	Triton X-100	0,04%
	in PBS-Puffer	
<b>Antikörper- Verdünnungslösung, pH 7,4 (für IF)</b>	BSA	0,5%
	Triton X-100	0,04%
	in PBS-Puffer	

## 3.2. Methoden

---

### 3.2.1. Verwendete Mäuse und Diät

---

Die knockout Mäuse wurden mindestens 7 Generationen in den genetischen Hintergrund des Mausstamms C57Bl/6J zurückgekreuzt. Als Kontrolltiere dienten genetisch nicht modifizierte Mäuse des gleichen Stamms. Die untersuchten *Task1*<sup>-/-</sup> Tiere stammten aus dem Labor von W. Wisden (IZN, Universität Heidelberg)(75). Die *Kcnq1*<sup>-/-</sup> Tiere erhielten wir über Florian Lang (Physiologie, Tübingen) von Karl Pfeifer. Alle Mäuse hatten freien Zugang zu Futter und Wasser, unterlagen einem 12-Stunden hell-dunkel-Rhythmus und wurden unter gleichen Bedingungen in offener Tierhaltung gehalten. Alle Experimente wurden nach dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und wurden von den Tierschutzbehörden vor Ort genehmigt. Die Nahrung der Tiere bestand aus Pellets mit einem Natriumgehalt von 0,27% und einem Kaliumgehalt von 0,75% von der Firma ssniff, Soest, Deutschland.

### 3.2.2. Plasma- und Organgewinnung

---

Zur Plasmagewinnung wurde den Mäusen unter Narkose (1:1 Sauerstoff-Stickstoff-Gemisch, das 1,5-3% Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Germany) enthält) mit Hilfe von heparinisierten Kapillaren Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen und mit einer Hämatokritzentrifuge für 5 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Die erhaltenen Plasmaproben wurden bis zur Aldosteronanalyse bei -20°C eingefroren. Anschließend wurde nach Eröffnung des Abdomens die Blutversorgung einer Nebenniere unterbunden und diese Nebenniere für die RNA-Extraktion in flüssigem Stickstoff eingefroren. Über einen in die Aorta abdominalis eingeführten Polyethylenkatheter wurde zunächst eine heparinisierte 0,9%ige NaCl-Lösung infundiert, während das Blut durch einen Schnitt in die Vena cava entfernt und das Tier damit in tiefer Narkose ausgeblutet wurde. Anschließend wurden die Gewebe der getöteten Maus durch Perfusion mit Fixierlösung I (3%ige

Paraformaldehydlösung – „PFA“) fixiert. Die Fixierung entsteht durch Quervernetzung der Proteine. Anschließend wurde die zweite Nebenniere entnommen und in 1%iger PFA mit 17% Sucrose äquilibriert. Dies soll Schäden beim Gefrieren und Austrocknen bei der Anfertigung von Gefrierschnitten vorbeugen. Zum Vermeiden von Rissbildung beim Einfrieren wurde die zweite Nebenniere schrittweise, beginnend mit -30° C in 2-Methylbutan, auf die Temperatur von flüssigem Stickstoff herunter gekühlt. Beide Nebennieren wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

### 3.2.3. Plasmaaldosteron

---

Zur Bestimmung des Plasmaaldosterons der wildtyp und *Task1<sup>-/-</sup>* Mäuse wurde ein ELISA (Dbc-Diagnostics Biochem Canada Inc., Emergo Europe, Den Haag, NL) durchgeführt. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Die Aldosteronkonzentration in den Proben wurde durch Analyse der an einem Mikrotiterplatten-Photometer (TECAN Sunrise, Tecan Trading AG, CH) gemessenen OD-Werte bestimmt. Die Auswertung erfolgte in einer Exeldatei.

### 3.2.4. Immunfluoreszenzfärbung

---

Mit Hilfe eines Kryostats wurden 5 µm dicke Gefrierschnitte auf Polylysin-Objektträgern (Kindler, Freiburg, D) angefertigt. Die gewonnenen Schnitte wurden bis zur Färbung bei -20° C aufbewahrt. Für die Anfertigung von Immunfluoreszenzfärbungen wurden die zu färbenden Schnitte zu Beginn für 5 Minuten in PBS gewaschen, um das Einbettmedium, in das die Nebenniere zum Anfertigen der Gefrierschnitte eingebettet wurde, zu entfernen. Zur Demaskierung der Epitope wurden die Schnitte anschließend mit einer 0,1%igen SDS-Lösung in PBS für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte nochmals in PBS gewaschen, um überschüssiges SDS zu entfernen. Nach Waschen in PBS wurden die Schnitte mit den jeweiligen Primärantikörpern in der jeweiligen Verdünnung beschichtet und bei 4° C über Nacht inkubiert. Sowohl der

Primärantikörper als auch der Sekundärantikörper wurden in einer 0,5% BSA/0,04% Triton-X100/PBS Lösung verdünnt. Das Triton-X-100 permeabilisiert die Zellmembranen und erleichtert so den Zugang zu den Epitopen während das BSA blockt, sodass die Antikörper weniger unspezifisch binden. Am nächsten Tag wurde nach einem 5-minütigen Waschschrift mit PBS eine Stunde lang mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit den Schnitten nach 5-minütigem Waschen mit PBS, kurz in MilliQ-Wasser eingetaucht, um Kristallisationen von Salzen vorzubeugen, und schließlich mit Glycergel Mounting Medium (Dako, Hamburg, D) und Deckgläschen (A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D) eingedeckelt. Bis zur Auswertung am Fluoreszenz-Mikroskop wurden die gefärbten Schnitte bei 4° C und Dunkelheit gelagert. Die Analyse der Färbungen erfolgte an einem Filtrerrad-basierenden Imagingsystem (Devices Corporation, Downingtown, PA, USA), welches an ein inverses Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss, Jena, D) gekoppelt war.

### 3.2.5. RNA-Isolierung

---

RNA aus Nebennieren wurde mit dem RNeasy-Mikro-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend den Vorgaben des Herstellers isoliert. Zum Homogenisieren der Nebennieren wurde vorerst ein der Größe des Eppendorfcups entsprechender Pistill, anschließend eine 27G Spritze, mit der das Lysat jeweils zehn Mal auf- und abpipettiert wurde, verwendet. Zum Schluss des Homogenisiervorgangs wurde das Lysat auf eine Schreddersäule (Qiagen, Hilden, Deutschland) übertragen. Nach Pipettieren des Lysats in die Schreddersäule wurde für 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf mit dem RNeasy-Mikro-Kit weiter verarbeitet. Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA wurde über ein Agarosegel (1,5% Agarose, Verhältnis der 28S zur 18S rRNA-Bande sollte ca. 2:1 betragen) und die Konzentration mit einem UV-Photospektrometer (Genova, Jenway, Essex, E ),(OD bei 260 nm, OD von 1 entspricht 40 ng/µL RNA, Verhältnis 260/280 nm 1,8 - 2,0) bestimmt. Zur Berechnung der Konzentration auf Basis der optischen Dichte wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Konzentration} = \text{Extinktion} \times 50 \times 40$$

Der Multiplikationsfaktor 50 entstand durch den Verdünnungsfaktor, der Faktor 40 ist RNA-spezifisch. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die isolierte Gesamt-RNA bei -80° C eingefroren.

### 3.2.6. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

---

Für die cDNA-Synthese wurde die isolierte Gesamt-RNA mit Hilfe von Random Primern, die eine zufällige Sequenz besitzen, in komplementäre DNA umgeschrieben. Somit ist gewährleistet, dass die komplette RNA in cDNA transkribiert wird. Dafür wurde eine M-MLV-Reverse-Transkriptase und der dazu gehörige 5-fach Puffer (Promega, Mannheim, Deutschland) sowie jeweils 1 µg der zu transkribierenden RNA verwendet. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Für die drei erforderlichen Temperaturschritte (20°C, 50°C und 70°C) wurde der Thermocycler T1 (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, D) verwendet. Um Qualität und Quantität der neu synthetisierten cDNA zu überprüfen wurde eine β-Aktin PCR durchgeführt. Als Enzym diente die Taq-Polymerase und der dazu gehörige Kit von der Firma Eurobio (Eurobio, Les Ulis Cedex B, F); es wurden Primer für β-Aktin mit einer Amplikonlänge von 661 bp verwendet. Um eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA auszuschließen, wurden Negativkontrollen ohne Zugabe von reverser Transkriptase angesetzt. Die entstandene cDNA wurde bis zur Weiterverwendung für die Realtime-PCR bei 4° C gelagert.

### 3.2.7. Realtime-PCR

---

Um die Genexpression der Kaliumkanäle und des Enzyms Aldosteronsynthase zu quantifizieren, wurde das System der Realtime-PCR (quantitative Echtzeit-PCR) angewendet. Diese wurde an einem LightCycler480-Gerät durchgeführt. Dabei wurden spezifische, wenn möglich intron spanning Primer sowie ein SybrGreen Mastermix



verwendet. Der Farbstoff SYBR® Green hat den Vorteil, dass mehrere Moleküle des Farbstoffs an ein doppelsträngiges DNA-Produkt binden, und somit das Signal relativ stark ist. In dieser Arbeit wurden die Expressionen der Kaliumkanäle Kcnq1, Kcne2, Kcne3, Kcne4, Kcne5, Task2, Task3, Trek1, maxiK (Kcnma1) und der Enzyme Steroid-11- $\beta$ -Hydroxylase (Cyp11b1) und Aldosteronsynthase (Cyp11b2) untersucht. Die SybrGreen-spezifische Anregungswellenlänge lag bei 483 nm, die emittierte Wellenlänge bei 533 nm. Zur Ermittlung der Effizienz wurden verschiedene Verdünnungen des aus allen Proben gepoolten Standards eingesetzt und daraus eine Standardkurve erstellt. Die Genexpressionsmengen der o.g. Zielgene wurde zur  $\beta$ -Aktin-Expression in Relation gesetzt, um sie mit einander vergleichbar zu machen. Die Spezifität der PCR-Ergebnisse wurde mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese und Schmelzkurven beurteilt.

### 3.2.8. Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot

Die für den Western Blot bestimmte Nebenniere wurde der mit Isofluran narkotisierten Maus entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei  $-80^{\circ}$  C aufbewahrt. Um ein Proteinlysate herzustellen, wurde die Nebenniere mit einem Mörser in RIPA-Puffer und anschließend mit einer 27 Gauge-Kanüle durch 10-maliges auf- und abziehen homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min auf Eis wurden überschüssige Zelltrümmer durch 8-minütige Zentrifugation bei  $4^{\circ}$  C bei 13000 g vom Lysat getrennt. Vom Überstand wurde die Proteinkonzentration photometrisch mittels Bradford-Assay (Biorad, München, D) bei 595 nm bestimmt. Die Proteinlysate wurden dann mit reduzierendem Lämmli-Probenpuffer (mit 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt. Nach 5-minütigem Erhitzen auf  $45^{\circ}$  C, wurden die verschiedenen Proteinmassen mittels 8%iger SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulphat Polyacrylamid Gelelektrophorese) bei 25 mA (mit konstantem Strom) aufgetrennt. Anschließend wurden die erhaltenen Proteinbanden mit einem Semi-dry-blotter (Biorad, München, D) für 90 min bei 100 mA (konstanter Strom) auf eine PVDF-Membran transferiert. Ein darauf folgender Waschschrift diente der Entfernung des im Transferpuffer enthaltenen Methanols und SDS, welche zum Ausfällen des später

verwendeten BSA führen können und außerdem die Antikörperbindung an die Membran stören.

Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer 5%igen Trockenmagermilchlösung in PBS-Tween (0,1% Tween-20) inkubiert. Nach mehrfachem Waschen mit PBS-Tween (s.o.) wurde die geblottete Membran mit einem in Store-Buffer (s. „Material“) gelöstem Primärantikörper (1:250 bzw. 1:500) über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der gewaschene Blot 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem in 1 % Trockenmagermilchlösung (in PBS-Tween) gelösten Sekundärantikörper (HRP goat anti rabbit IgG, 1:7500) beschichtet. Wiederum nach mehrfachem Waschen in PBS-Tween wurde der Western Blot bis zur Entwicklung in PBS bei 4° C gelagert. Die Bindung des an den Primärantikörper gebundenen Sekundärantikörpers, der somit das Epitop des nachzuweisenden Proteins markiert, wurde mit Hilfe einer luminolgekoppelten HRP (horseradish peroxidase)-Reaktion (Santa Cruz, Heidelberg, D) auf lichtempfindlichem Film (Fotochemische Werke GmbH, Berlin) durchgeführt.

### 3.2.9. In-vivo Einfluss des KCNQ1-Blockers HMR 1556 auf die Aldosteronausschüttung

Untersucht wurden männliche wildtyp Mäuse mit Normal- und Hochkaliumdiäten (300 mM Kaliumchlorid + 12 % Saccharose im Trinkwasser). Um den Einfluss des Kcnq1-Blockers HMR 1556 auf die Aldosteronausschüttung zu untersuchen, wurde einer mit zwischen 1,5 und 2 vol% Isofluran narkotisierten Maus intraperitoneal HMR 1556 und/oder Synacthen, ein ACTH-Analogon (Sigma-tau Arzneimittel GmbH, Düsseldorf, D) mittels einer Insulinspritze in einer Konzentration von 5 µg/g Gewicht gespritzt. Bei einem Teil der Versuche wurden beide Substanzen, die jeweils in verschiedenen Lösungsmitteln (DMSO oder isotone NaCl) gelöst waren, injiziert. Um unspezifische Lösungsmittelleffekte zu testen, wurden bei Kontrolltieren beide Lösungsmittel (ohne Substanz) und bei Injektion von nur einer Substanz das jeweils andere Lösungsmittel an einem anderen Ort intraperitoneal (um Ausfällungen zu vermeiden) injiziert. Zusätzlich wurden auch Kontrollmäuse nicht injiziert um eine mögliche Wirkung, die

allein auf die Injektion zurückzuführen ist, erfassen zu können. Eine halbe Stunde nach Narkoseeinleitung wurde eine Kombination der genannten Wirkstoffe injiziert und gleichzeitig eine erste Kontrollblutprobe entnommen. Anschließend folgten drei weitere Blutentnahmen im Abstand von 15 min, 30 min und 60 min. Die Blutentnahmen erfolgten mittels heparinisierter Glaskapillaren durch Schwanzinzision. Das gewonnene Vollblut wurde auf Eis gekühlt und für 5 min zentrifugiert, um das Plasma zu gewinnen, welches bis zur Aldosteronmessung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurde. Nach Abschluss der Probengewinnung wurde das Plasma mittels eines ELISAs auf die Aldosteronkonzentration hin untersucht.

#### 3.2.10. Kastration und Testosterongabe bei Wildtypmännchen

Es wurden 5 Wochen alte C57Bl/6J Mäuse mit Isofluran narkotisiert und über eine skrotale Inzision kastriert. Als Kontrolle dienten sham-operierte Mäuse. Im Alter von 10 Wochen bekamen beide Gruppen täglich subkutane Injektionen mit entweder in Sesamöl gelöstem Testosteron (1  $\mu\text{g/g}$  Gewicht, Testosteronpropionat, Sigma) oder nur Sesamöl (Vehikel). Nach einer 6-tägigen Hormontherapie/Kontrollinjektion wurden die Mäuse wiederum mit Isofluran narkotisiert und jeweils eine Nebenniere als Realtime-PCR-Probe, die andere für Immunfluoreszenzfärbungen entnommen. Dieses Experiment wurde von Dr. Sascha Bandulik und Dr. David Penton-Ribas der Arbeitsgruppe Prof. Warth durchgeführt. Mit ihrer Erlaubnis werden die Ergebnisse in dieser Arbeit gezeigt.

### 3.2.11. 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: Phänotypisierung der *Task1*<sup>-/-</sup> Mäuse

---

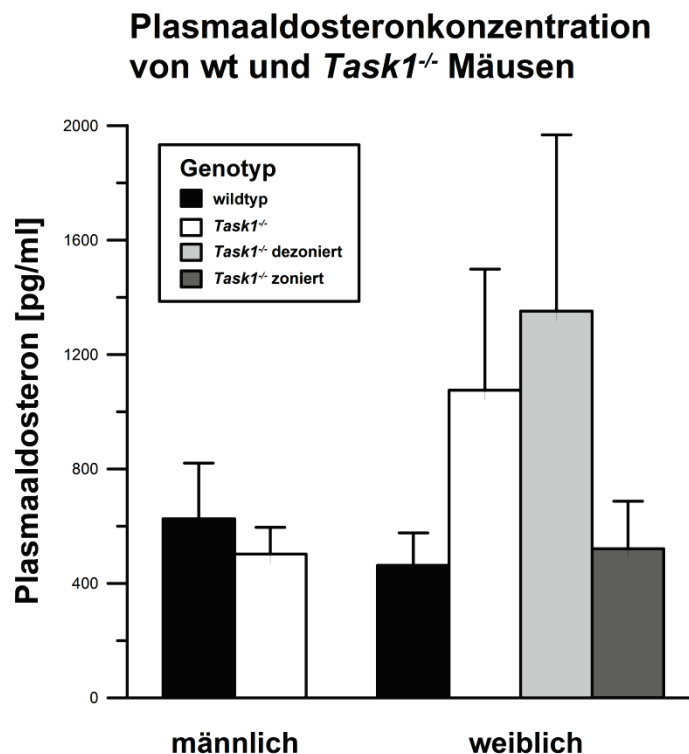
Es ist bekannt, dass ein Knockout des *Task1*-Gens bei weiblichen Mäusen zu einem Hyperaldosteronismus und einer Umverteilung der Aldosteronsynthese von der Zona glomerulosa in die Zona fasciculata führt; männliche Mäuse zeigen diese Veränderung nur vor der Pubertät (11). Die von einem *Task1*-knockout betroffenen Weibchen zeigen jedoch nicht alle denselben Phänotyp, d.h. nicht alle haben übermäßig hohe Plasmaaldosteronwerte und nicht alle exprimieren die Aldosteronsynthese in der Zona fasciculata. Um die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse auf diese Veränderungen hin zu untersuchen, wurde bei allen Mäusen im Plasma mittels eines ELISAs die Aldosteronkonzentration [pg/ml] bestimmt. Die Nebennieren dieser Mäuse wurden von 1 - 36 durchnummeriert und werden im Folgenden mit „NN 1 - 36“ bezeichnet. Den Mäusen mit den Nummern 1 - 24 wurde außerdem eine Nebenniere für Immunfluoreszenzfärbungen und die andere für mRNA-Bestimmungen mittels RT-PCR entnommen. Den Mäusen mit den Nummern 31 - 36 wurden ebenfalls Plasma und eine Nebenniere für Immunfluoreszenzfärbungen, die andere jedoch für Westernblotuntersuchungen entnommen. Da jeder Maus ein Plasmaaldosteronwert, eine Immunfluoreszenzfärbung und eine mRNA-/Proteinexpression zugewiesen werden kann, ist ein direkter Vergleich der verschiedenen Untersuchungsergebnisse für jede einzelne Maus möglich (z.B. ob ein hoher Plasmaaldosteronwert mit einer Dezonierung korreliert). Unsere Arbeitsgruppe hatte bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen, die älter als 1 Jahr waren, die Wiedererlangung einer normalen Zonierung beobachtet. Zudem bestand die Dezonierung der Nebenniere vor der Pubertät geschlechtsunabhängig. Das Alter der hier verwendeten Mäuse betrug 3 - 7 Monate und lag damit in einem Bereich, bei dem der ausgeprägte geschlechtsabhängige Phänotyp der *Task1*<sup>-/-</sup> Mäuse zu erwarten war.

Im Folgenden werden wildtyp Mäuse (*Task1*<sup>+/+</sup>) mit „wt“ gekennzeichnet und homozygote knockout Mäuse mit *Task1*<sup>-/-</sup>.

## 4.1. Charakterisierung des adrenalen Phänotyps der *Task1<sup>-/-</sup>* Mäuse

### 4.1.1 Plasmaaldosteronkonzentrationen

Mit Hilfe eines ELISAs wurden die Plasmaaldosteronkonzentrationen für jede einzelne Maus bestimmt. Die *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen besaßen die höchsten Aldosteronkonzentrationen ( $990 \text{ pg/ml} \pm 388$ ,  $n=10$ ), gefolgt von den wildtyp Männchen ( $626 \pm 194 \text{ pg/ml}$ ,  $n=5$ ), den *Task1<sup>-/-</sup>* Männchen ( $502 \pm 93 \text{ pg/ml}$ ,  $n=5$ ) und den wildtyp Weibchen ( $462 \pm 113 \text{ pg/ml}$ ,  $n=10$ ). Der Mittelwert und die Standardabweichung der dezonierten (dz) *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen waren höher als die der zonierten (z) *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen (dz:  $1352 \pm 615 \text{ pg/ml}$ ,  $n=6$ ; z:  $447 \pm 138 \text{ pg/ml}$ ,  $n=4$ ). Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Plasmaaldosteronkonzentration zwischen den Gruppen gefunden.



**Abbildung 6: Plasmaaldosteronkonzentration von wt und *Task1<sup>-/-</sup>* Mäusen.**

Die dezonierten *task1<sup>-/-</sup>* Weibchen zeigen die größten Aldosteronkonzentrationen im Plasma. Die zonierten *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen besitzen ähnliche Mengen Aldosteron im Plasma wie die Wildtypen. Generell bestehen zwischen Männchen und Weibchen keine großen Unterschiede. Aufgrund der starken Variation der Aldosteronsekretion bei *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen und aufgrund der kleinen Anzahl an Versuchstieren, sind alle o.g. Unterschiede nicht signifikant. Man beachte die große Streubreite der Aldosteronkonzentrationswerte, v.a. bei den *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen. Die hellgraue und die dunkelgraue Säule zeigen eine Aufspaltung der Daten, die in der weißen Säule der Weibchen dargestellt sind.

#### 4.1.2. Cyp11b2-mRNA-Expressionen

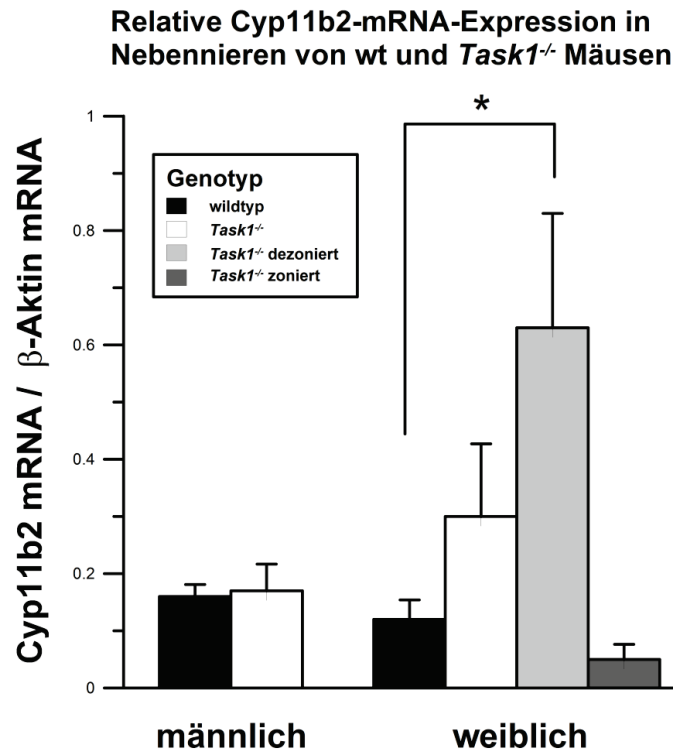
Um herauszufinden, ob die erhöhte Adosteronkonzentration auf das aldosteronproduzierende Enzym Cyp11b2 (Aldosteronsynthase) zurückzuführen ist, wurde eine relative Quantifizierung mit Hilfe einer Realtime-PCR durchgeführt. Es gibt keine Cyp11b2-mRNA Ergebnisse für die NN 31 - 36, da von diesen Mäusen keine Nebenniere für Messungen zur Verfügung stand – sie wurden für das Westernblotverfahren verwendet.

wt Weibchen			<i>task1</i> <sup>-/-</sup> Weibchen			wt Männchen			<i>task1</i> <sup>-/-</sup> Männchen		
	<u>Aldosteron</u>	<u>Cyp11b2*</u>		<u>Aldosteron</u>	<u>Cyp11b2*</u>		<u>Aldosteron</u>	<u>Cyp11b2*</u>		<u>Aldosteron</u>	<u>Cyp11b2*</u>
	[pg/ml]			[pg/ml]			[pg/ml]			[pg/ml]	
<b>NN1</b>	731	0,3	<b>NN2</b>	833	0,033	<b>NN3</b>	365	0,154	<b>NN4</b>	521	0,336
<b>NN5</b>	464	0,167	<b>NN6 **</b>	4360	0,628	<b>NN7</b>	873	0,228	<b>NN8</b>	655	0,144
<b>NN9</b>	286	0,059	<b>NN10 **</b>	1287	0,840	<b>NN11</b>	1275	0,147	<b>NN12</b>	204	0,117
<b>NN13</b>	220	0,043	<b>NN14</b>	268	0,083	<b>NN15</b>	341	0,181	<b>NN16</b>	402	0,062
<b>NN17</b>	1217	0,145	<b>NN18</b>	463	0,042	<b>NN19</b>	277	0,101	<b>NN20</b>	731	0,191
<b>NN21</b>	149	0,074	<b>NN22 **</b>	619	0,427						
<b>NN23</b>	304	0,069	<b>NN24 ***</b>	818	0,024						
<b>NN34</b>	123		<b>NN31 **</b>	292							
<b>NN35</b>	861		<b>NN32 **</b>	739							
<b>NN36</b>	275		<b>NN33</b>	227							
<b>Mittelwert</b>	<b>463</b>	<b>0,123</b>		<b>991</b>	<b>0,297</b>		<b>626</b>	<b>0,162</b>		<b>502</b>	<b>0,170</b>
<b>SEM</b>	114	0,034		388	0,127		194	0,021		94	0,046
<b>n</b>	10	7		10	7		5	5		5	5
*** Übergangszonierung (Definition s.u.)											
** dezontiert											
* RT-PCR: normalized expression ( $Expressionshöhe_{Zielgen} = \frac{Effizienz_{Ct\ Referenzgen}}{Effizienz_{Ct\ Zielgen}}$ )											

**Tabelle 1: Cyp11b2-mRNA-Expression in Nebennieren und Plasmaaldosteronkonzentration von wt & *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Die Cyp11b2-Werte sind normalisiert auf das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin. Die  $Task1^{-/-}$  Weibchen besitzen sowohl die höchsten Plasmaaldosteronwerte als auch die größte Cyp11b2-mRNA-Expression.  $Task1^{-/-}$  Weibchen mit einer dezontierten Aldosteronsynthese exprimieren signifikant mehr Cyp11b2 als die wildtyp Weibchen. Werte der einzelnen Versuchstiere aus Abbildung 6 und 7 tabellarisch dargestellt.

Die dezontierten  $Task1^{-/-}$  Weibchen besitzen eine höhere Cyp11b2-mRNA-Expression als die mit zontierter Aldosteronsynthese (dz: 0,63; z: 0,05). Dieser Unterschied ist jedoch nur signifikant, wenn man die NN24, die eine Übergangszonierung besitzt, nicht zu der Gruppe der dezontierten Nebennieren dazuzählt ( $p = 0,037$ ,  $n(dz) = 3$ ,  $n(z) = 4$ ).



**Abbildung 7: graphische Darstellung der Cyp11b2-Expression in Nebennieren von  $Task1^{-/-}$  und wt Mäusen.**

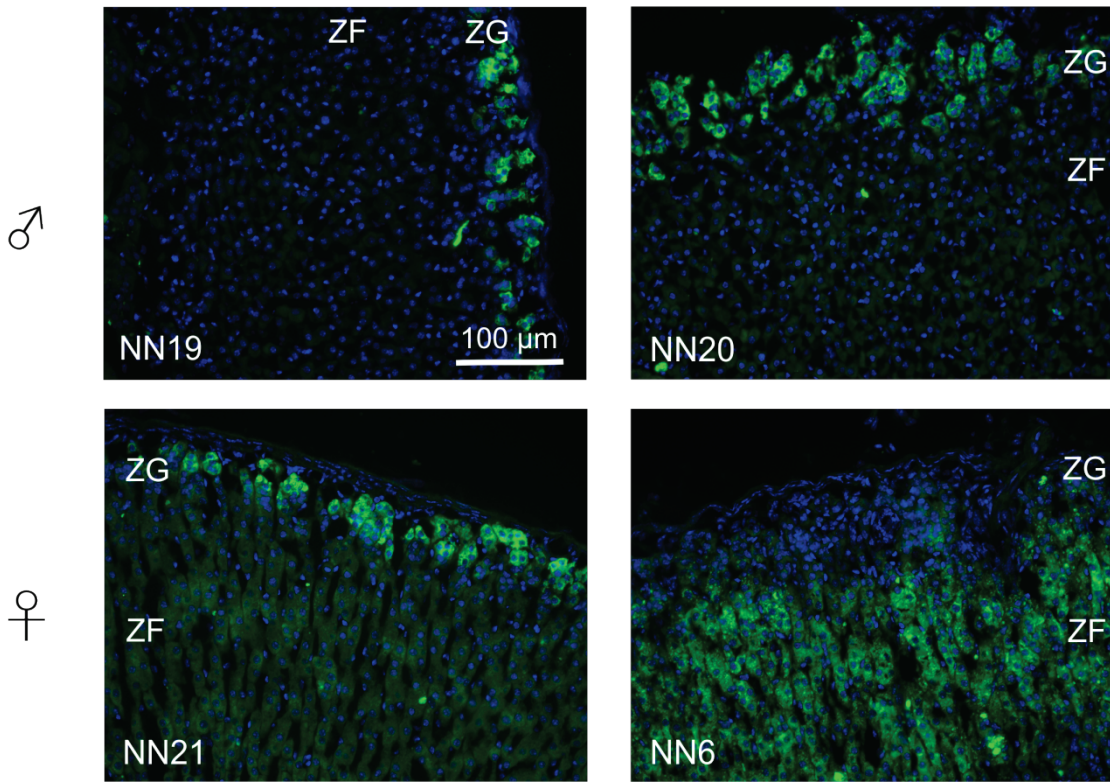
Dezontierte  $Task1^{-/-}$  Weibchen zeigen die höchste relative Cyp11b2 mRNA-Expression. Wird die NN24 nicht zu den dezontierten Mäusen sondern als übergangszoniert (Aldosteronsynthese sowohl in der Zona glomerulosa als auch in der Zona fasciculata, s. folgendes Kapitel) eingestuft, so ist der Unterschied in der Cyp11b2-Expression der dezontierten  $Task1^{-/-}$  im Vergleich zu den wt Weibchen signifikant (\*). Die hellgraue und die dunkelgraue Säule zeigen eine Aufspaltung der Daten, die in der weißen Säule der Weibchen dargestellt sind.



#### 4.1.3. Aldosteronsynthese in Immunfluoreszenzfärbungen

---

Anstatt ihres natürlichen Vorkommens in der Zona glomerulosa, der äußersten Schicht der Nebennierenrinde, findet man die Aldosteronsynthese bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen in der Zona fasciculata. Allerdings ist diese Fehllokalisierung bei den einzelnen Mäusen unterschiedlich stark ausgeprägt. Um Aussagen über die Lokalisation der Aldosteronsynthese bei den hier verwendeten Mäusen machen zu können, wurden mit Kryoschnitten der Nebenniere Immunfluoreszenzfärbungen der Aldosteronsynthese angefertigt. Um die Bilder miteinander vergleichen zu können, wurden bei allen Aufnahmen die gleichen Einstellungen für die Belichtungszeit und die Skalierung gewählt. Es wurden insgesamt 30 Schnitte (NN1 - 24 und NN 31 - 36) gefärbt und ausgewertet. Bei 60% der *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen färbte die Aldosteronsynthese in der Zona fasciculata anstatt in der Zona glomerulosa (im Folgenden werden diese Nebennieren als „dezoniert“ bezeichnet) (n=10). Bei allen wildtyp Mäusen und *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen befand sich die Aldosteronsynthese in der Zona glomerulosa, wie es physiologisch normal ist („zoniert“). Einige Immunfluoreszenzbilder sind der besseren Vergleichbarkeit wegen mehrfach gezeigt. Um die Mehrfachnennung leichter erkennbar zu machen, wurde den Nebennieren eine individuelle Nummer zugeteilt (z.B. „NN6“ in Abbildungen 8, 9 und 10).

**Wildtyp*****Task1*<sup>-/-</sup>**

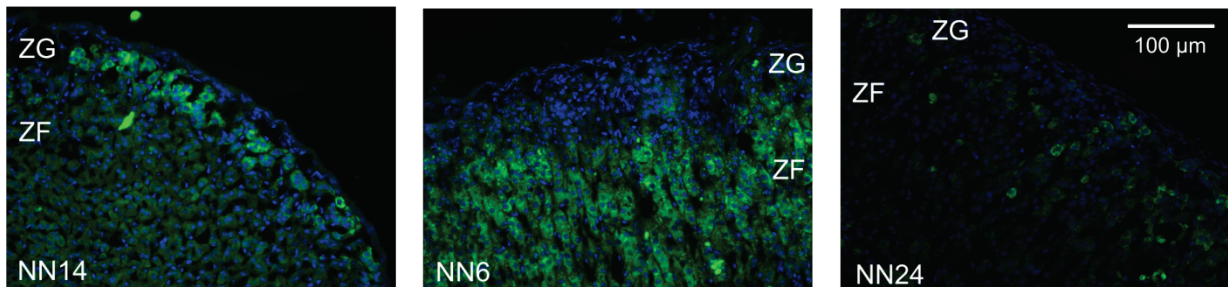
**Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung der Aldosteronsynthase (grün) in Nebennieren von wt & *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Die weiblichen und männlichen wildtyp Mäuse färben in ihren Nebennierenrinden die Aldosteronsynthase (grün) im Bereich der Zona glomerulosa, wie es physiologischer Weise der Fall ist. Das *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen (NN20) ist ebenfalls korrekt zioniert. Das *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen (NN6) hingegen färbt deutlich mehr Zellen an und diese in der Zona fasciculata. Dieser Befund korreliert mit dem deutlich erhöhten Plasmaaldosteronwert (4360 pg/ml) der Maus Nr. 6. Nicht alle *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen sind dezioniert, einige färben sehr gering, andere in der Zona glomerulosa. ZG = Zona glomerulosa, ZF = Zona fasciculata. Kernfärbung in blau gezeigt.

**zionierte**  
*Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen

**dezionierte**  
*Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen

**übergangszionierte**  
*Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen



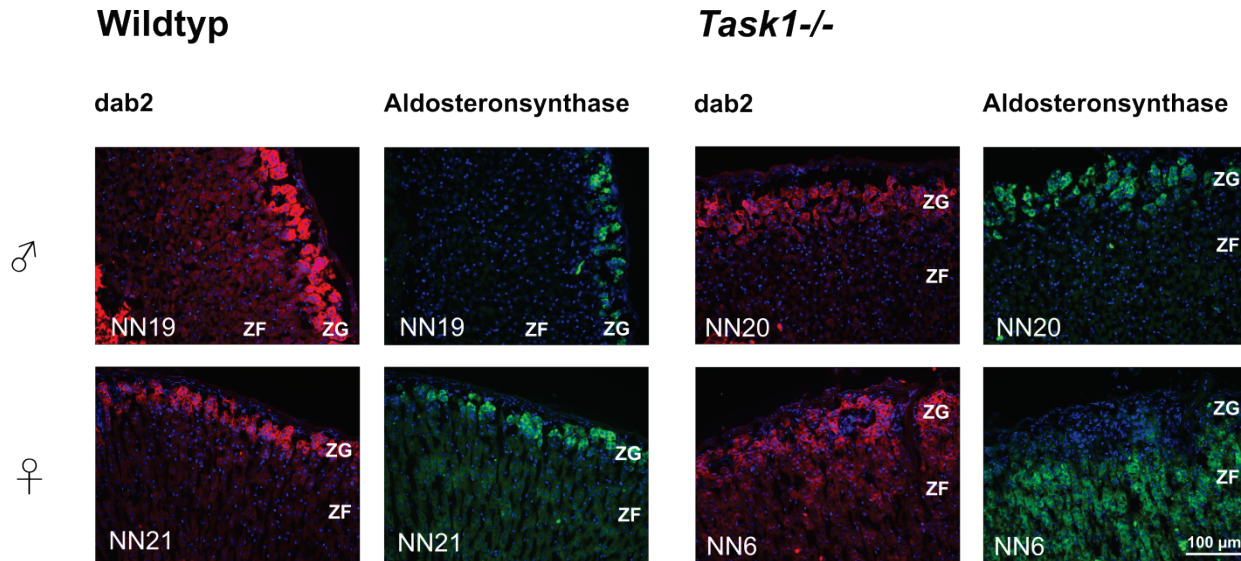
**Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung für Aldosteronsynthase (grün) in Nebennieren von weiblichen *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Die Graphik zeigt jeweils ein *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen, bei der die Aldosteronsynthase (grün) zioniert, dezioniert oder übergangszioniert ist. Die NN14 zeigt eine normale Zonierung, bei der die Aldosteronsynthase sich in der Zona glomerulosa befindet. Die NN6 ist dezioniert, färbt also die Aldosteronsynthase in der Zona fasciculata. Die NN24 hingegen besitzt keine eindeutige Zonierung. Sie

färbt sowohl in Zellen der Zona glomerulosa als auch in Zellen der Zona fasciculata. Sie wird daher als Nebenniere mit Übergangszonierung betrachtet. ZG = Zona glomerulosa, ZF = Zona fasciculata. Kernfärbung in blau gezeigt.

#### 4.1.4. Breite der Zona glomerulosa

Um die Breite der Zona glomerulosa beurteilen zu können, wurde in allen Nebennieren auch dab2 (disabled-2), ein Marker für ausdifferenzierte Glomerulosazellen, angefärbt (76). Diese Färbung sollte dazu dienen, Hinweise darauf zu finden, ob die Aldosteronsynthese enthaltenden Zellen bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen eher Eigenschaften der Zona glomerulosa oder fasciculata besitzen.



**Abbildung 10: Lokalisation von dab2 (rot) und Aldosteronsynthase (grün) in Nebennieren von wildtyp & *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Der Zona glomerulosa (ZG) Marker dab2 (disabled-2) ist bei wildtyp Männchen und Weibchen sowie bei *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen und zonierte Weibchen nur in der äußersten Zellschicht zu finden. Bei der weiblichen *Task1*<sup>-/-</sup> Maus ist die Grenze zwischen Zona glomerulosa und Zona fasciculata (ZF) dagegen anhand der dab2-Färbung weniger deutlich ausgeprägt. So ist bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen auch in der ZF eine schwache Färbung von dab2 nachweisbar. Außerdem wirkt die Zona glomerulosa sowohl bei *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen wie auch bei den Weibchen breiter als bei den Wildtypen. Kernfärbung in blau gezeigt.

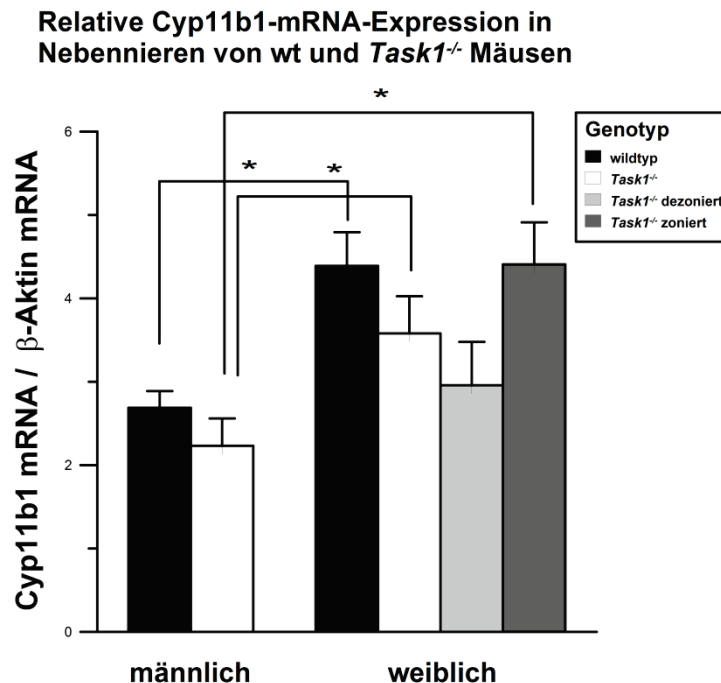
Bei den dezonierten *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen ist die Zona glomerulosa verbreitert, d.h. einzelne Glomerulosazellen ragen in die Zona fasciculata hinein. Insbesondere ist zu beobachten, dass die Nebenniere mit der höchsten Plasmaaldosteronkonzentration (NN6, Aldosteron: 4360 pg/ml) die stärkste Dezonierung und die breiteste Zona glomerulosa besitzt, wobei in der verbreiterten Zona glomerulosa keine

Aldosteronsynthese zu finden ist. Die Maus mit dem zweithöchsten Plasmaaldosteronwert (NN10, Aldosteron: 1287 pg/ml) besitzt ebenfalls eine verbreiterte Zona glomerulosa. Der Hyperaldosteronismus bei *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen scheint folglich mit der Dezonierung der Aldosteronsynthese und der Breite der Zona glomerulosa, auch wenn hier kein Aldosteron produziert wird, zu korrelieren.

#### 4.1.5. Cyp11b1-mRNA-Expressionen

---

Neben der Konzentration des Aldosterons und der Cyp11b2-Expression wurde auch das Corticosteron-bildende-Enzym Cyp11b1 analysiert. Cyp11b1 wird üblicherweise in der Zona fasciculata produziert und sollte der Beurteilung der Funktion dieser Zone dienen. Dadurch sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Fehllokalisierung der Aldosteronsynthese Auswirkungen auf die Cyp11b1-Expression hat. Normalerweise haben Weibchen eine ca. 3-fach höhere Corticosteronkonzentration im Plasma als Männchen (77). Auch das Enzym Cyp11b1 ist normalerweise bei Weibchen in höheren Konzentrationen vorhanden, was mit meinen Realtime-PCR-Ergebnissen bestätigt werden konnte.



**Abbildung 11:** graphische Darstellung der Cyp11b1-mRNA-Expression in Nebennieren von *Task1*<sup>-/-</sup> und wt Mäusen.

Die Cyp11b1-Expression ist bei Weibchen sowohl bei Wildtypen als auch bei *Task1*<sup>-/-</sup> signifikant höher als bei Männchen. Dies gilt sowohl für die Knockouts allgemein als auch für die zonierten *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen im Vergleich zu den *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen. Es bestehen keine Unterschiede zwischen dezonierten und zonierten *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen. Die hellgraue und die dunkelgraue Säule zeigen eine Aufspaltung der Daten, die in der weißen Säule der Weibchen dargestellt sind.

Dezonierte Weibchen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Cyp11b1-mRNA-Expression im Vergleich zu den zonierten Weibchen. Wildtypweibchen und *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen zeigten eine höhere Cyp11b1-mRNA-Konzentration als die jeweiligen Männchen. Auch die zonierten *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen im Speziellen besaßen eine höhere Cyp11b1-Expression als die *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen.

#### 4.2. mRNA-Expression verschiedener, potentiell kompensatorisch wirksamer K<sup>+</sup>-Kanäle

Die durch Realtime-PCR gewonnenen Daten zu mRNA-Expressionen der hier untersuchten Kaliumkanäle wurden v.a. unter zwei Gesichtspunkten analysiert. Zum einen sollten unterschiedliche Expressionsmengen zwischen den Geschlechtern, zum anderen Unterschiede in der Expression zwischen Genotypen (An- oder Abwesenheit des *Task1*-Gens) aufgedeckt werden. Um geschlechtsabhängige Unterschiede zu finden wurden u.a. die Auswirkungen von Kastration und Testosterongabe bei

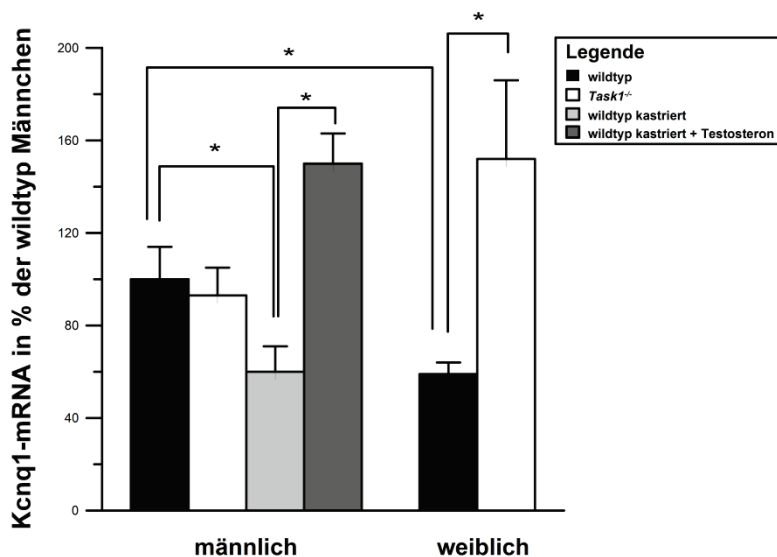
männlichen Mäusen untersucht. Männliche wt Mäuse wurden kastriert oder sham operiert und bekamen anschließend entweder ein Vehikel oder Testosteron injiziert. Die Ergebnisse der wildtyp Männchen und die der sham operierten Männchen zeigten keine signifikanten Unterschiede und wurden deshalb in einer Gruppe zusammengefasst. Im Folgenden wird diese Gruppe als „wt m“ bezeichnet. Die Expressionen der verschiedenen Gene werden in Prozent der Wildtypmännchen (100%) angegeben. Zu den testosteronabhängig exprimierten Kaliumkanälen gehören u.a. Kcnq1, Task3, Trek1, Kcnma1, Kcne3 und Kcne4. Kcnq1, Kcnma1, Task3, Kcne3 und Kcne4 werden nicht nur geschlechtsabhängig, sondern auch in Abhängigkeit vom Genotyp unterschiedlich stark exprimiert. Dagegen hatte der Genotyp bei Trek1, Task2, Kcne2 und Kcne5 keinen Einfluß auf die Expressionhöhe.

#### 4.2.1. Kcnq1

---

Kastrierte Männchen besaßen gegenüber wt Männchen eine niedrigere Kcnq1-Expression. Anschließende Testosterongabe konnte die Kcnq1-Expression wieder signifikant anheben. Wildtyp Weibchen besaßen weniger Kcnq1 als wildtyp Männchen. *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen hingegen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Kcnq1-Expression gegenüber den *Task1<sup>-/-</sup>* Männchen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kcnq1 mRNA-Expression bei Wildtypmäusen geschlechtsabhängig ist und durch Kastration und Testosterongabe maßgeblich beeinflusst werden kann. Bei *Task1<sup>-/-</sup>* Mäusen ist die geschlechtsspezifische Expression in umgekehrter Relation vorhanden; hier besitzen *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen tendenziell mehr Kcnq1 als die *Task1<sup>-/-</sup>* Männchen; dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

### Relative Kcnq1-mRNA-Expression in Nebennieren von wt und *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen



**Abbildung 12: graphische Darstellung der relativen Kcnq1-mRNA-Expression in Nebennieren von wt & *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen.**

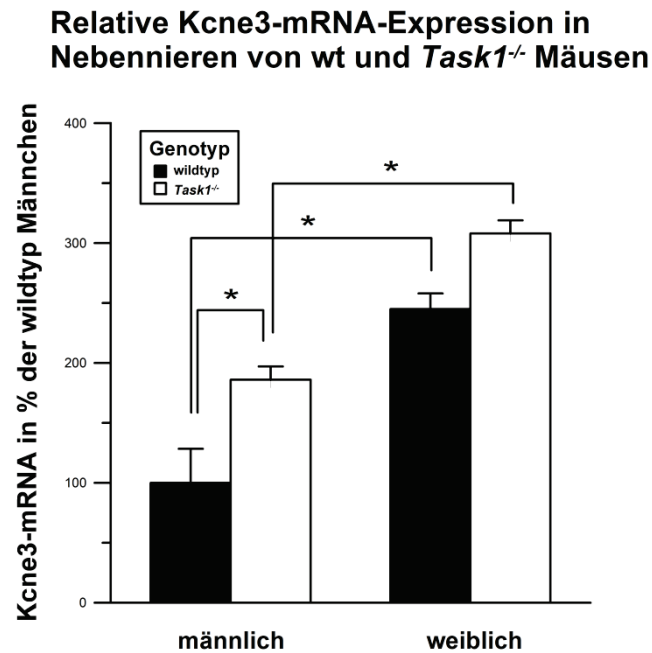
Wildtyp Männchen exprimieren mehr Kcnq1 als wildtyp Weibchen. Auch die *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen zeigen deutlich höhere Kcnq1-mRNA-Expressionen als die wt Weibchen. Kastration von wildtyp Männchen verringert deren Kcnq1-Expression. Anschließende Testosterongabe erhöht diese Expression signifikant.

Es war kein Unterschied in der Kcnq1-Expression zwischen Wildtyp und *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen zu sehen. *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen hatten jedoch eine um ca. 90% höhere Expression als die wildtyp Weibchen. Eine weitere Aufteilung in zonierte und dezonierte knockout Weibchen zeigte keine signifikanten Unterschiede – u.a. wegen der hohen Streubreite der dezonierten Weibchen (z: 150 ± 37%, n=3; dz: 154 ± 57%, n=4; p = 0,947). Diese Ergebnisse konnten zeigen, dass der Knockout von *Task1* bei Weibchen eine Hochregulation des Kcnq1-Gens bewirkt und der Kanal geschlechtsspezifisch und von Testosteron abhängig exprimiert wird.

#### 4.2.2. Kcne3

Die Beta Untereinheit Kcne3 des Kcnq1-Kanals ändert dessen biophysikalische Eigenschaften. Sie bewirkt eine rasche Aktivierung und Inaktivierung des Kcnq1-Stroms (78). Die Kcne3-Expressionsmengen aller untersuchten Nebennieren waren sehr gering. Dennoch wurden geschlechtsspezifische Unterschiede beobachtet. Die

Nebennieren von sowohl wt Weibchen als auch *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen enthielten mehr Kcne3 als die entsprechenden Männchen. Weibchen synthetisierten also unabhängig von *Task1* mehr Kcne3 als Männchen.



**Abbildung 13: graphische Darstellung der relativen Kcne3-mRNA-Expression in Nebennieren von wt & *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen.**

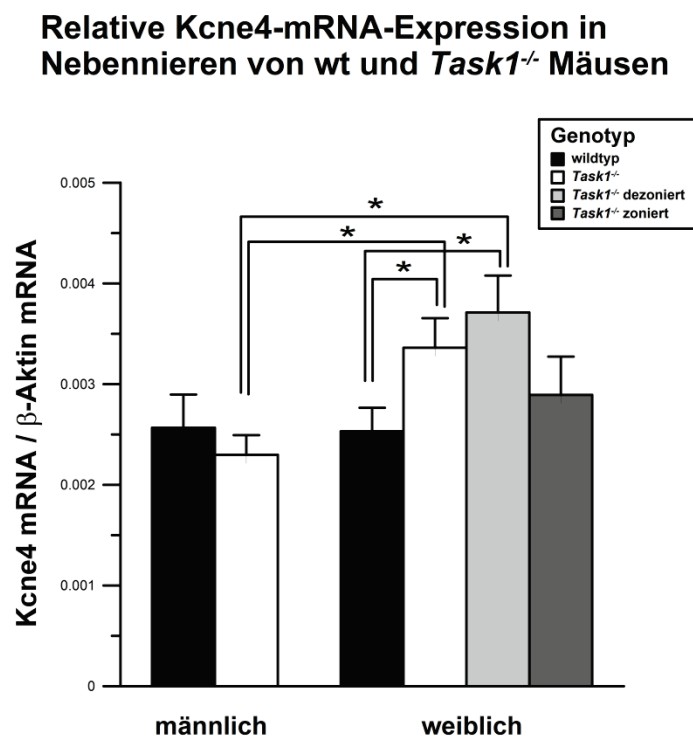
Sowohl bei den Wildtypen als auch bei den *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen die Weibchen höhere Kcne3-Expressionen als die Männchen. *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen haben, verglichen mit den wildtyp Männchen, erhöhte Expressionsmengen. Die erhöhte Expression ist jedoch im Vergleich zu den *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen trotzdem noch signifikant geringer. Für Kcne3 liegen keine Kastrationsdaten vor.

Die Betauntereinheit Kcne3 war bei *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen in höheren Mengen vorhanden als bei den Wildtypen. Zwischen den dezonierten, zonierten und Wildtypen bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Kcne3-Expression. So käme die Untereinheit Kcne3 als Mitspieler bei der Kompensation für *Task1* in Frage.



### 4.2.3. Kcne4

Auch Kcne4 wurde geschlechtsabhängig exprimiert, jedoch nur bei *Task1<sup>-/-</sup>* Mäusen! Unter den knockout Mäusen besaßen die Weibchen höhere Mengen an Kcne4-mRNA als Männchen. Jedoch waren auch hier die Expressionsmengen generell relativ gering. Im Gegensatz zu Kcne3 wurde die mRNA der Untereinheit Kcne4 bei den *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen in signifikant größeren Mengen exprimiert als bei den Wildtypen. Betrachtete man von den knockout Mäusen nur die dezonierte, so war der Unterschied zu den wildtyp Weibchen noch stärker zu sehen (wt w:  $99 \pm 9\%$ , n=7; dz ko w:  $145 \pm 10\%$ , n=4; p = 0,038). Daran lässt sich erkennen, dass abhängig vom Dezonierungsgrad, die Untereinheit Kcne4 höher exprimiert wird.



**Abbildung 14: graphische Darstellung der relativen Kcne4-mRNA-Expression in Nebennieren von wt & *Task1<sup>-/-</sup>* Mäusen.**

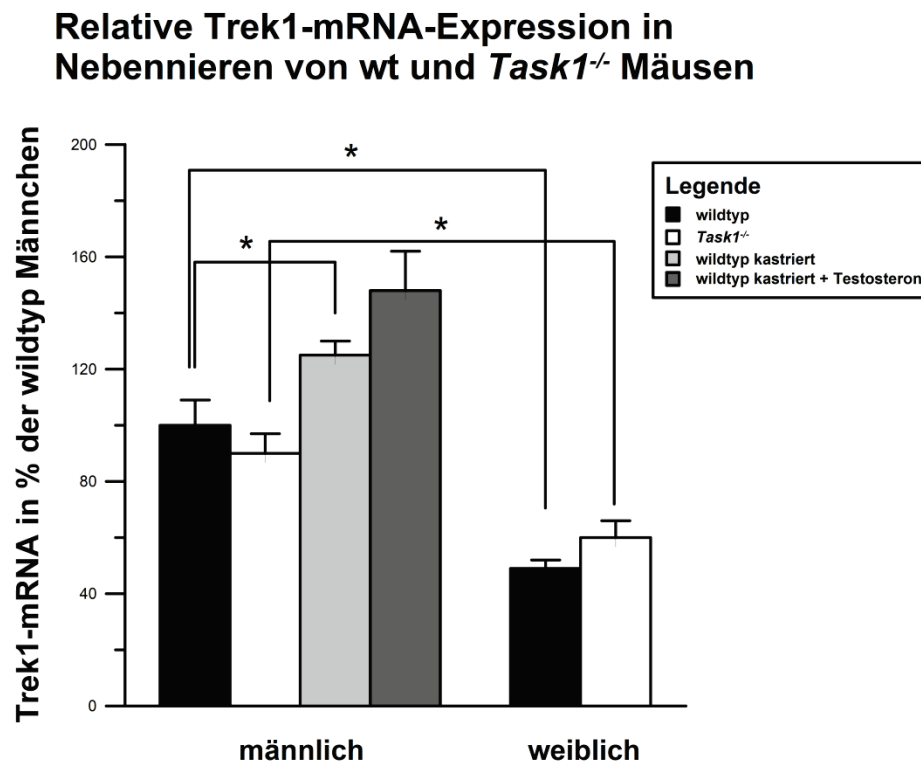
*Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen exprimieren mehr Kcne4 als wt Weibchen und knockout Männchen. Für die Kcne4-Expression liegen keine Kastrationsdaten vor.

Auch die Untereinheiten Kcne1, Kcne2 und Kcne5 wurden analysiert. Kcne1 war bei den untersuchten Nebennieren nicht nachweisbar. Kcne2 und Kcne5 zeigten generell

eine sehr geringe Expressionshöhe und keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

#### 4.2.4. *Trek1*

Kastrierte Männchen zeigten gegenüber den wildtyp Männchen erhöhte *Trek1*-Expressionen, die sich durch Testosterongabe nicht veränderten. Wildtyp Weibchen besaßen weniger *Trek1*-mRNA als wildtyp Männchen. Bei den *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen besaßen die Weibchen ebenfalls weniger *Trek1* als die Männchen. Weibchen haben also generell weniger *Trek1* als Männchen, dies ist jedoch nicht allein auf den Mangel an Testosteron zurückzuführen. Die *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen zeigten gegenüber den wildtyp Weibchen erhöhte *Trek1*-mRNA-Mengen (nicht signifikant).



**Abbildung 15: graphische Darstellung der relativen *Trek1*-mRNA-Expression in Nebennieren von wt & *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Die wildtyp und *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen exprimieren signifikant mehr *Trek1*-mRNA als die jeweiligen weiblichen Mäuse. Im Gegensatz zu den wildtyp Weibchen zeigen die *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen (unabhängig von der Zonierung) in der Tendenz mehr *Trek1* (nicht signifikant). Kastrierte wt Männchen besitzen höhere Expressionsmengen als die unkastrierten Wildtypen.

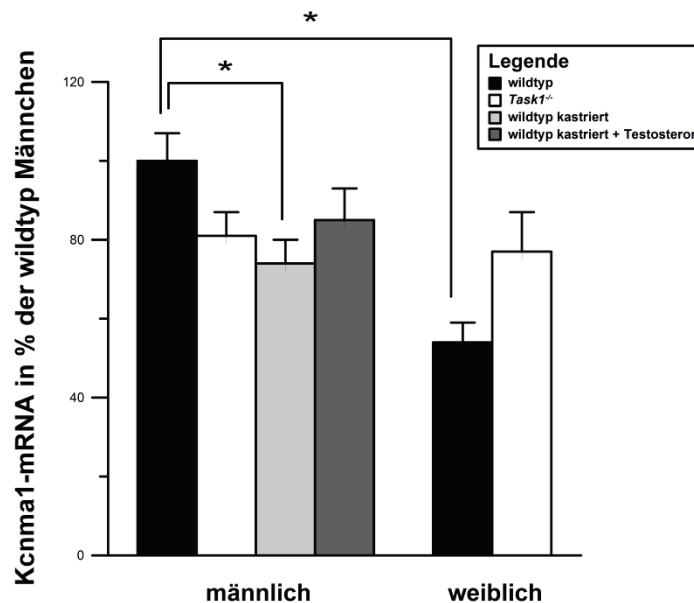
#### 4.2.5. Kcnma1 (maxiK)

---

Kastration der wildtyp Männchen bewirkte einen Abfall der Kcnma1-mRNA-Expression. Anschließende Testosterongabe konnte dies nicht verändern. Wildtyp Männchen wiesen eine höhere Kcnma1 (maxiK) Expression auf als wildtyp Weibchen. Es bestand kein Unterschied zwischen *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen und Weibchen in der Kcnma1-Expression. Kastrierte und weibliche Mäuse besaßen weniger Kcnma1 als wildtyp Männchen. Der *Task1*-knockout bewirkte ein sich angleichen beider Geschlechter (Zunahme bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen um ca. 20%, Abnahme bei *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen um ca. 20%).

Ein Vergleich zwischen wildtyp und *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen zeigte hier keinen signifikanten Unterschied in der Expression wobei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen tendenziell mehr Kcnma1 besitzen als die wildtyp Weibchen. Auch ein Vergleich zwischen wildtyp und *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen ergab keine unterschiedlichen Expressionsmuster. Die Nebennieren, bei denen die Aldosteronsynthese dezoniert gefärbt hatte, produzierten signifikant mehr Kcnma1-mRNA als wildtyp Weibchen, nicht jedoch mehr als zonierte *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen (wt w:  $54 \pm 5\%$ , n = 7; dz ko w:  $92 \pm 10\%$ , n = 4; p(wt vs dz) = 0,025; z:  $57 \pm 11\%$ , n = 3; p(z vs dz) = 0,078). Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass eine Dezonierung der Aldosteronsynthese bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen mit einer höheren Kcnma1-mRNA-Synthese einhergeht.

### Relative Kcnma1-mRNA-Expression in Nebennieren von wt und *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen



**Abbildung 16: graphische Darstellung der relativen Kcnma1-mRNA-Expression in Nebennieren von wt & *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen.**

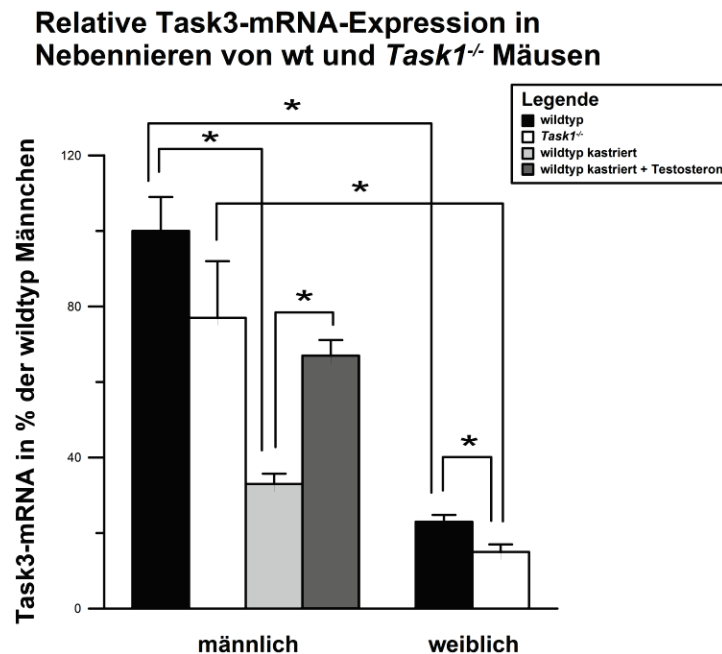
Wildtyp Männchen besitzen signifikant mehr Kcnma1-mRNA als die kastrierten wt Männchen und die wt Weibchen. Eine Testosterongabe bewirkt bei kastrierten wt Männchen einen geringen Anstieg der Kcnma1-Expression, der nicht signifikant ist. Bei den weiblichen Mäusen exprimieren die *Task1*<sup>-/-</sup> Tiere mit einer dezonierten Nebenniere signifikant mehr Kcnma1-mRNA als die Wildtypen (hier nicht gezeigt).

#### 4.2.6. Task3

Auch der Kanal Task3 ist geschlechtsabhängig exprimiert (8;11). Die Expression von Task3 nahm nach Kastration um ca. 70% ab. Testosterongabe konnte diesen Effekt z.T. rückgängig machen und die Task3-Expression um ca. 30% wieder anheben. Zudem besaßen die wildtyp Weibchen ca. 80% weniger Task3 als die Männchen. Bei den *Task1*-Knockouts war dies ebenfalls zu sehen; die Weibchen exprimierten ca. 60% weniger Task3 als die *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen. Der Kaliumkanal Task3 ist folglich testosteronabhängig exprimiert: Männchen synthetisieren mehr Task3-mRNA als Weibchen.

Neben der Abwesenheit von Testosteron ist auch die Abwesenheit von *Task1* ein wichtiger Faktor für die Task3-Expression. Bei Männchen scheint dies jedoch kein relevanter Aspekt zu sein. Wildtyp und *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen besaßen ähnliche Task3-Expressionsmuster. Weibchen dagegen hatten nach *Task1*-knockout geringere Task3-

mRNA-Mengen als die Wildtypen. Betrachtete man nur die dezonierten Nebennieren und verglich sie mit den Wildtypen, so war dieser Unterschied noch stärker zu sehen (wt w:  $23 \pm 1,8\%$ ,  $n = 7$ ; dz ko w:  $14 \pm 2\%$ ,  $n = 4$ ;  $p = 0,023$ ). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Weibchen der *Task1*-Knockout die Menge an Task3-Kanälen zu beeinflussen scheint. Unterschiede in der Task3-Expressionshöhe zwischen zonierten und dezonierten Nebennieren von *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen gab es nicht (z:  $16 \pm 3\%$ ,  $n = 3$ ; dz:  $14 \pm 2\%$ ,  $n = 4$ ;  $p = 0,726$ ).



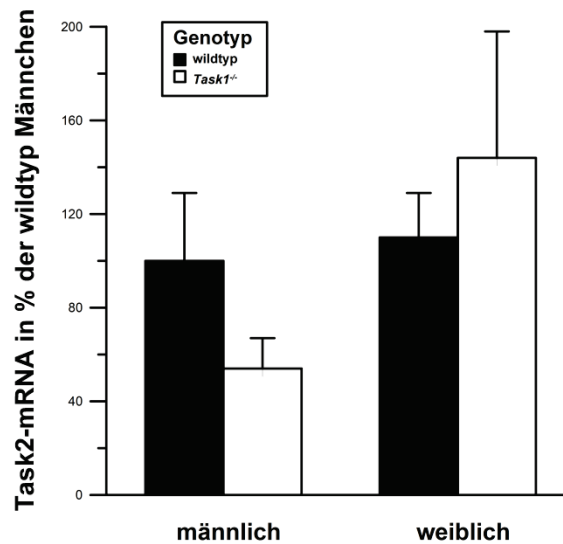
**Abbildung 17: graphische Darstellung der relativen Task3-mRNA-Expression in Nebennieren von wt & *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Sowohl bei den Wildtypen als auch bei den *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen besitzen die Männchen deutlich mehr Task3-mRNA als die Weibchen. In *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen ist die Task3-Expression noch geringer als bei wt Weibchen. Kastration von wt Männchen bewirkt eine Abnahme der Task3-Expression, die durch Testosterongabe signifikant wieder angehoben werden kann.

#### 4.2.7. Task2

Zu dem Kanal Task2 gibt es keine Daten zu kastrierten Mäusen. Es konnten keine Unterschiede in der Expression zwischen den Geschlechtern und den Genotypen nachgewiesen werden (wt m:  $100 \pm 9\%$ ,  $n = 8$ ; wt w:  $110 \pm 19\%$ ,  $n = 7$ ;  $p = 0,782$ ; ko m:  $54 \pm 13\%$ ,  $n = 5$ ; ko w:  $144 \pm 54\%$ ,  $n = 7$ ;  $p = 0,146$ ).

### Relative Task2-mRNA-Expression in Nebennieren von wt und *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen



**Abbildung 18:** graphische Darstellung der relativen Task2-mRNA-Expression in Nebennieren von wt & *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen.

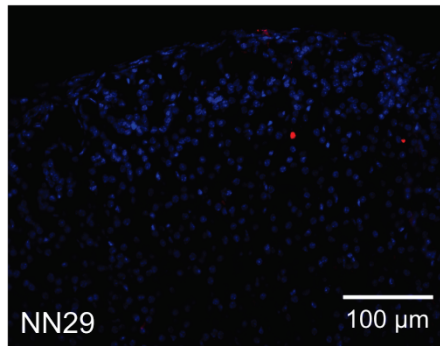
Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Für Task2 liegen keine Kastrationsdaten vor.

#### 4.3. Immunfluoreszenzfärbungen von *Kcnq1* und *Task3*

Zur Untersuchung der Lokalisation und im geringen Maße auch der Expressionsstärke verschiedener Kaliumkanäle in der Nebennierenrinde wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

##### 4.3.1. Lokalisation von *Kcnq1* in der Nebenniere von wildtyp und *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen

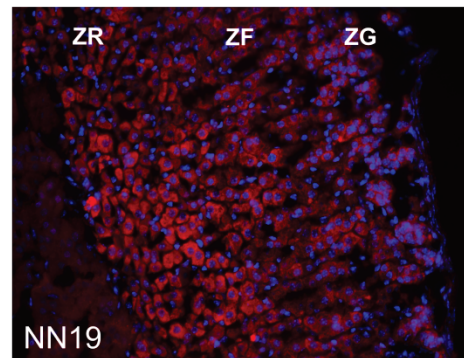
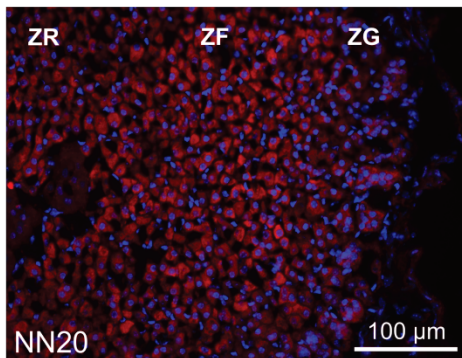
Zur Beurteilung der Lokalisation von *Kcnq1* in der Nebennierenrinde wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen *Kcnq1* durchgeführt. Insgesamt wurden 30 Nebennieren (darunter Männchen, Weibchen, wildtyp sowie *Task1*<sup>-/-</sup> Mäuse) gefärbt. Im Folgenden wurden repräsentative Schnitte ausgewählt. Zur Sicherstellung der Spezifität des Antikörpers wurden auch Nebennieren von *Kcnq1*<sup>-/-</sup> Mäusen gefärbt (s.u.). Diese zeigten keine gefärbten Areale, sodass dieser Antikörper für die folgenden Färbungen verwendet wurde.

***Kcnq1*<sup>-/-</sup> ♀**

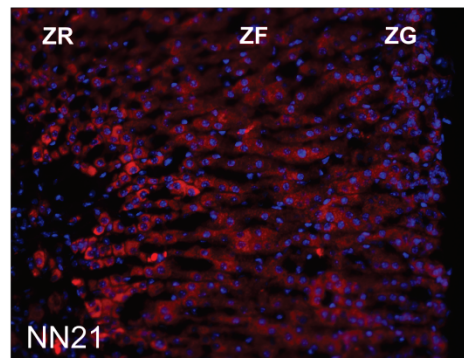
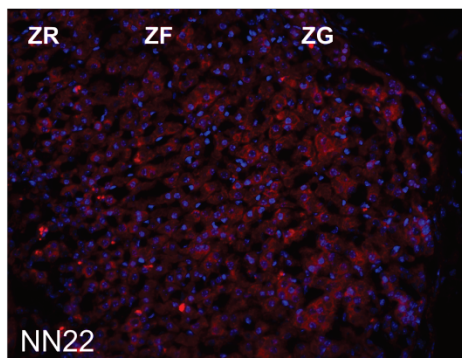
**Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung mit Kcnq1 (rot) in einer Nebenniere einer *Kcnq1*<sup>-/-</sup> Maus.**  
Die Nebenniere der *Kcnq1*<sup>-/-</sup> Maus zeigt keine Färbung mit dem Kcnq1-AK, daher ist dieser spezifisch und wurde für die folgenden Färbungen verwendet. Kernfärbung in blau gezeigt.

***Task1*<sup>-/-</sup>****wildtyp**

♂



♀



**Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung mit Kcnq1 (rot) in Nebennieren von wt & *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Das wildtyp Männchen besitzt v.a. in der Zona reticularis (ZR) eine starke Färbung. Die Zellen sind nicht nur im Bereich der Membran gefärbt sondern auch im Zytoplasma. Das wildtyp Weibchen ist deutlich weniger markiert, färbt aber ebenfalls vor allem in der Zona reticularis. Die *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen exprimieren weniger Kcnq1-Protein als die *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen. Außerdem scheint Kcnq1 bei der NN22 eher in der Zona fasciculata (ZF) als in der Zona reticularis zu liegen, wie bei der NN20 und den Wildtypmäusen. ZG = Zona glomerulosa, ZF = Zona fasciculata, ZR = Zona reticularis. Kernfärbung in blau gezeigt.

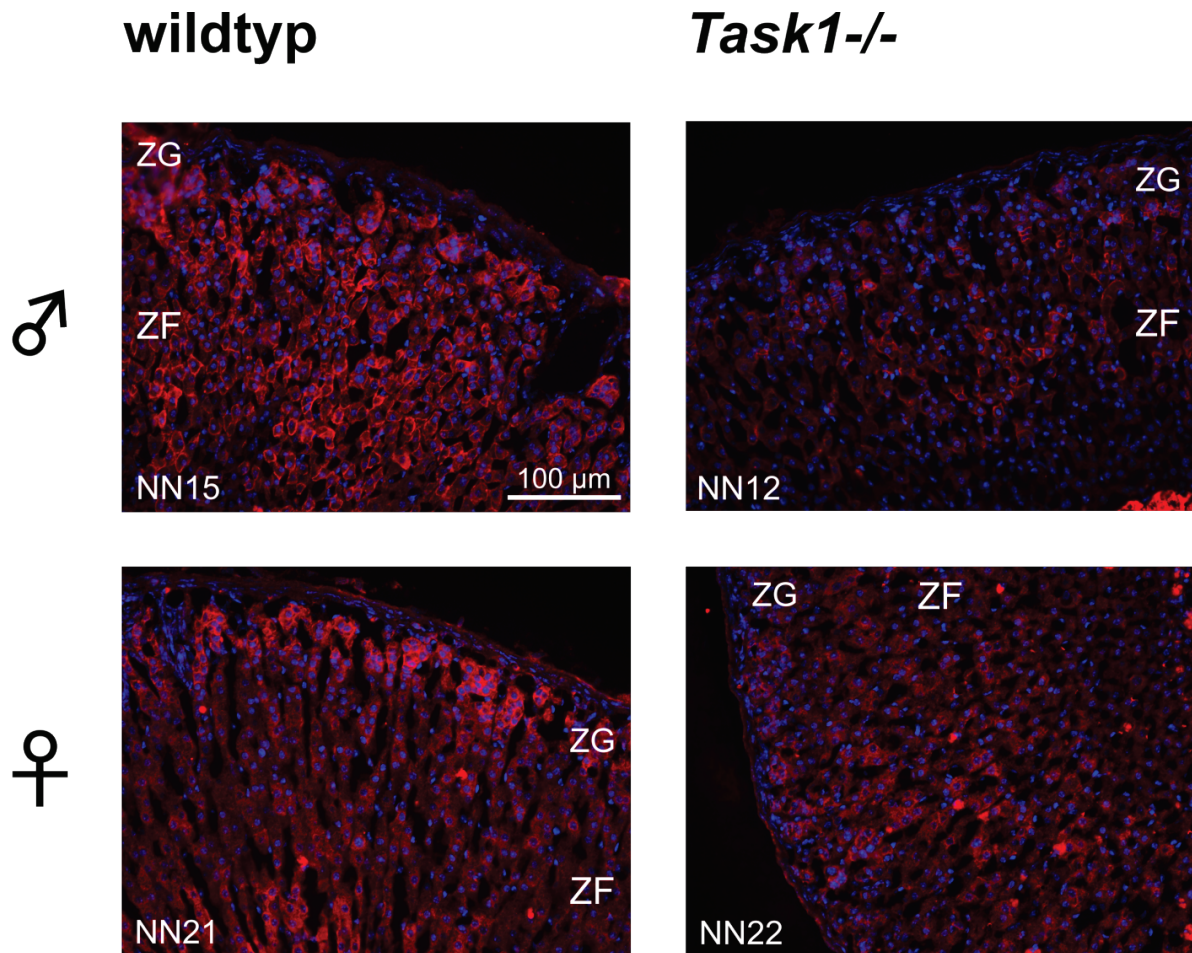
Die Färbung scheint eher das Zytoplasma als die Zellmembran markiert zu haben. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei diesen Mäusen, die meisten Kanäle noch im Zellinneren gespeichert liegen und noch nicht in die Zellmembran eingebaut wurden. Außerdem kann man erkennen, dass die wildtyp Männchen mehr Kcnq1 exprimieren als die wildtyp Weibchen. Dies entspricht auch den Realtime-PCR-Daten, an denen ein Unterschied zwischen Männchen und Weibchen zu sehen war, der jedoch nicht signifikant ausfiel. Die Hauptlokalisierung dieses Kanals scheint im Bereich der Zona reticularis, der innersten Zone der Nebennierenrinde zu liegen.

Die mRNA-Expression von Kcnq1 war in *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen höher als in *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen (siehe Kapitel „mRNA-Expression verschiedener, potentiell kompensatorisch wirksamer K<sup>+</sup>-Kanäle“ Absatz „KCNQ1“). Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte dagegen eine höhere Expressionstärke in den männlichen *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den Weibchen. Allerdings war die Färbung bei den weiblichen *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen eher membranständig zu finden, während die Lokalisation bei den männlichen *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen, wie bei den wildtyp Mäusen, vorwiegend zytosolisch war. Im Vergleich zu den Wildtypen sind bei beiden Geschlechtern auch Zellen der ZF angefärbt, so dass die Expression innerhalb der Nebennierenrinde insgesamt breiter erscheint.

#### 4.3.2. Lokalisation von Task3 in der Nebenniere von wildtyp und *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen

Männchen exprimierten in der Nebenniere generell mehr Task3 als Weibchen. Bei Männchen war dieser Kanal nicht, wie bei Weibchen, nur auf die Zona glomerulosa beschränkt sondern auch in der Zona fasciculata stark vertreten. Interessanter Weise schien der Task3-Kanal bei Männchen eher in der Zellmembran und bei Weibchen sowohl in der Zellmembran als auch im Zytoplasma lokalisiert zu sein. Die Immunfluoreszenzfärbungen erlauben zwar keine absolute Quantifizierung der Expressionsstärke, jedoch scheinen die Männchen in den unten gezeigten Färbungen mehr Task3 zu exprimieren als die Weibchen.





**Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung mit Task3 (rot) in Nebennieren von wt &  $Task1^{-/-}$  Mäusen.**

Männchen exprimieren mehr Task3-Kanäle als Weibchen. Der Kanal ist bei NN15 über alle Zonen verteilt, aber hauptsächlich in der Zona fasciculata (ZF) vertreten. Die weibliche NN21 zeigt eher eine Zona glomerulosa (ZG) betonte sowie geringfügig Zona reticularis gebundene Expression dieses Kanals; in der Zona fasciculata fehlt er jedoch. Die männliche NN12 färbt Task3 v.a. in der Zona fasciculata, wie auch der Wildtyp. Dieser färbt jedoch eine größere Anzahl an Zellen. Die weibliche  $Task1^{-/-}$  NN22 zeigt kein eindeutiges Expressionsmuster (Expression sowohl in der Zona glomerulosa als auch in der Zona fasciculata). Auch sie ist weniger deutlich gefärbt als ihr Wildtypkorrelat. Außerdem scheinen die  $Task1^{-/-}$  Männchen eher die Zellmembran anzufärben, während die  $Task1^{-/-}$  Weibchen eher das Zytoplasma zu färben scheinen. Kernfärbung in blau gezeigt.

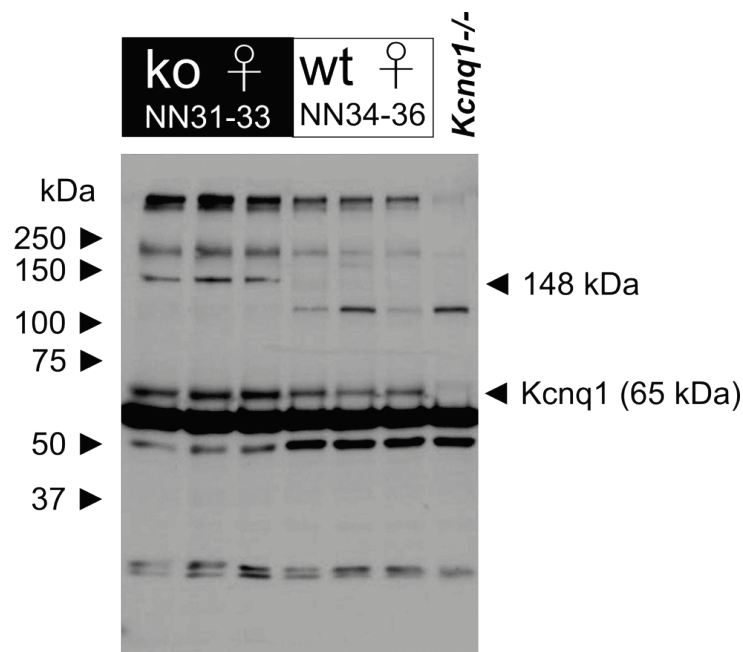
Auch bei den  $Task1^{-/-}$  Mäusen färbte Task3 stärker bei Männchen als bei Weibchen. Sowohl wt als auch  $Task1^{-/-}$  Männchen exprimierten Task3 in der Zona fasciculata. Wie schon bei den wildtyp Weibchen exprimierten auch die  $Task1^{-/-}$  Weibchen Task3 eher im Zytoplasma, die Männchen hingegen in der Zellmembran. Im Vergleich zwischen wildtyp und  $Task1^{-/-}$  Weibchen erwiesen sich die Wildtypen als Task3 stärker exprimierend.

#### 4.4. Western-Blot: Analyse der Proteinexpression von Kcnq1 und Kcnma1

Zur weiteren Analyse der Proteinexpression von Kcnq1 und Kcnma1 wurden Westernblots angefertigt. Zur Normalisierung der Daten wurde außerdem ein Westernblot auf das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin (siehe Abbildung 30) angefertigt. Als verwendete Proben dienten 6 Nebennieren (NN31 - 36) von denen die NN31 - 33 *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen, und die NN34 - 36 wildtyp Weibchen waren. Als Negativkontrolle diente die Nebenniere einer *Kcnq1*<sup>-/-</sup> Maus. In diesem Teil der Arbeit wurden keine männlichen Mäuse untersucht.

##### 4.4.1. Kcnq1-Proteinexpression bei *Task1*<sup>-/-</sup> und Wildtypmäusen

Für die folgenden Färbungen wurde, wie auch für die Immunfluoreszenzfärbungen, der Primärantikörper (rabbit) der Arbeitsgruppe Prof. TJ Jentsch verwendet (79). In dem Paper wird die Kcnq1-spezifische Bande mit einer Größe von ca. 65 kDa angegeben.



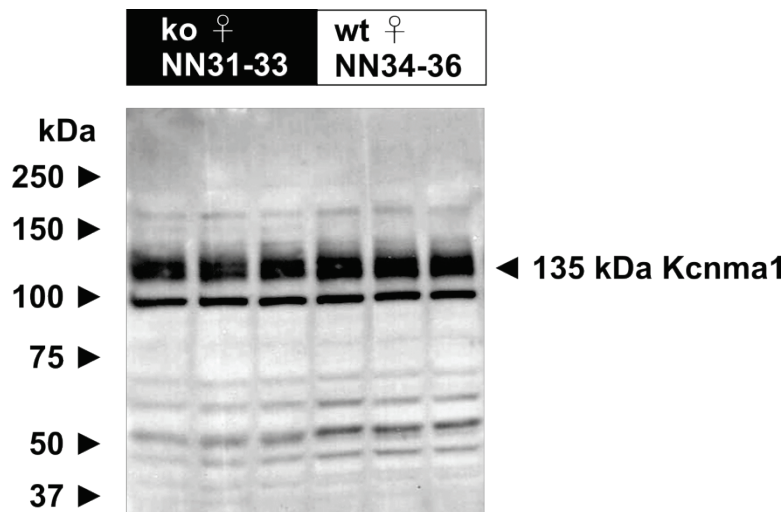
**Abbildung 22: Westernblot von murinen wt & *Task1*<sup>-/-</sup> Nebennieren und einer *Kcnq1*<sup>-/-</sup> Nebenniere mit Markierung für Kcnq1.**

Für den AK der Arbeitsgruppe Jentsch gegen Kcnq1 wurden mehrere Banden gefunden, die bei der *Kcnq1*<sup>-/-</sup> NN (Negativkontrolle) nicht färbten. Die für Kcnq1 relevanten Banden liegen auf Höhe von etwa 65 kDa und 148 kDa. Die *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen färben intensiver als die Wildtypen. ko = *Task1*<sup>-/-</sup>, wt = wildtyp.

Laut uniprot.org gibt es zwei Isoformen des Kcnq1-Proteins, welche durch alternative splicing zustande kommen. Diese Isoformen werden mit den Massen 62,6 und 74,5 kDa angegeben (<http://www.uniprot.org/uniprot/P97414>). Die unterschiedlichen Banden können dadurch zustandekommen, dass auch trunkierte Varianten, Splicevarianten oder Dimere markiert werden. V.a. die im Blot sichtbare Bande auf Höhe von 65 kDa könnte ein Kcnq1-Protein darstellen – sie ist in den wt und *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen vorhanden, nicht jedoch in der *Kcnq1*<sup>-/-</sup> Maus. Bei den *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen ist außerdem eine 148 kDa große Bande sichtbar, die einem Dimer aus zwei 74 kDa großen Proteinen entsprechen könnte und ebenfalls bei der *Kcnq1*<sup>-/-</sup> Maus nicht färbt. In wt Mäusen ist diese Bande nicht sichtbar. Betrachtet man beide Banden, scheinen die *Task1*<sup>-/-</sup> Mäuse jeweils mehr Kcnq1-Protein zu exprimieren als die wt Weibchen. Dieser Befund entspricht dem bereits erörterten Realtime-PCR-Ergebnis.

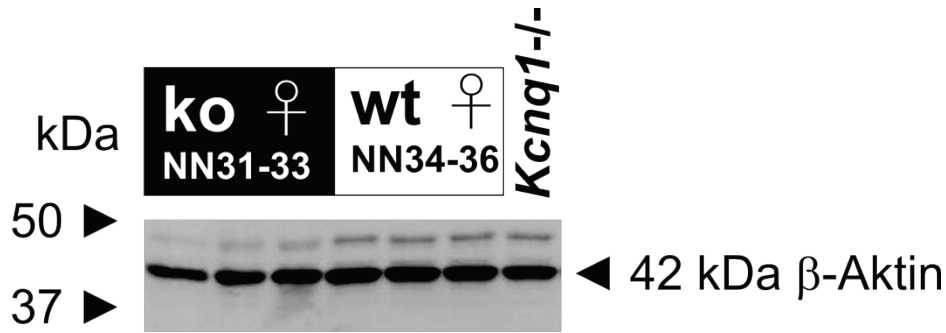
#### 4.4.2. Kcnma1 (maxiK) Proteinexpression bei *Task1*<sup>-/-</sup> und Wildtypmäusen

Für die Analyse des Ausmaßes an Kcnma1-Kanalproduktion wurde der gleiche Westernblot verwendet wie für Kcnq1; dieser wurde gestrippt und anschließend mit anti-Kcnma1-Antikörper inkubiert.



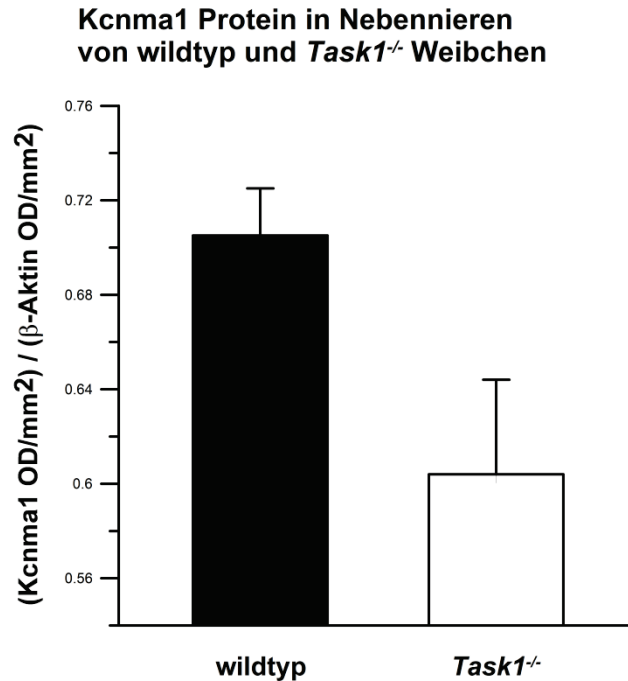
**Abbildung 23: Westernblot mit Markierung für Kcnma1.**

Der 135 kDa große Kcnma1-Kanal (maxiK) zeigt die stärkste Färbung bei den wt Nebennieren (NN). Die *Task1*<sup>-/-</sup> Nebennieren (NN) exprimieren Kcnma1 in geringerer Menge (gemessen mit OD im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin). ko = *Task1*<sup>-/-</sup>, wt = wildtyp.



**Abbildung 24: Westernblot von weiblichen *Task1*<sup>-/-</sup> & wt Nebennieren und *Kcnq1*<sup>-/-</sup> Nebenniere mit Markierung von β-Aktin.**

Das Gewebelysate wurde durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers β-Aktin markiert, welches eine Größe von 42 kDa besitzt (42 kDa Bande). Für nachfolgende Analysen wurde die Menge an β-Aktin optisch quantifiziert und zur Normierung der Menge an spezifischen Kanalproteinen verwendet. ko = *Task1*<sup>-/-</sup>; wt = wildtyp.



**Abbildung 25: graphische Darstellung der auf β-Aktin normierten Kcnma1-Kanal-Expressionen.**

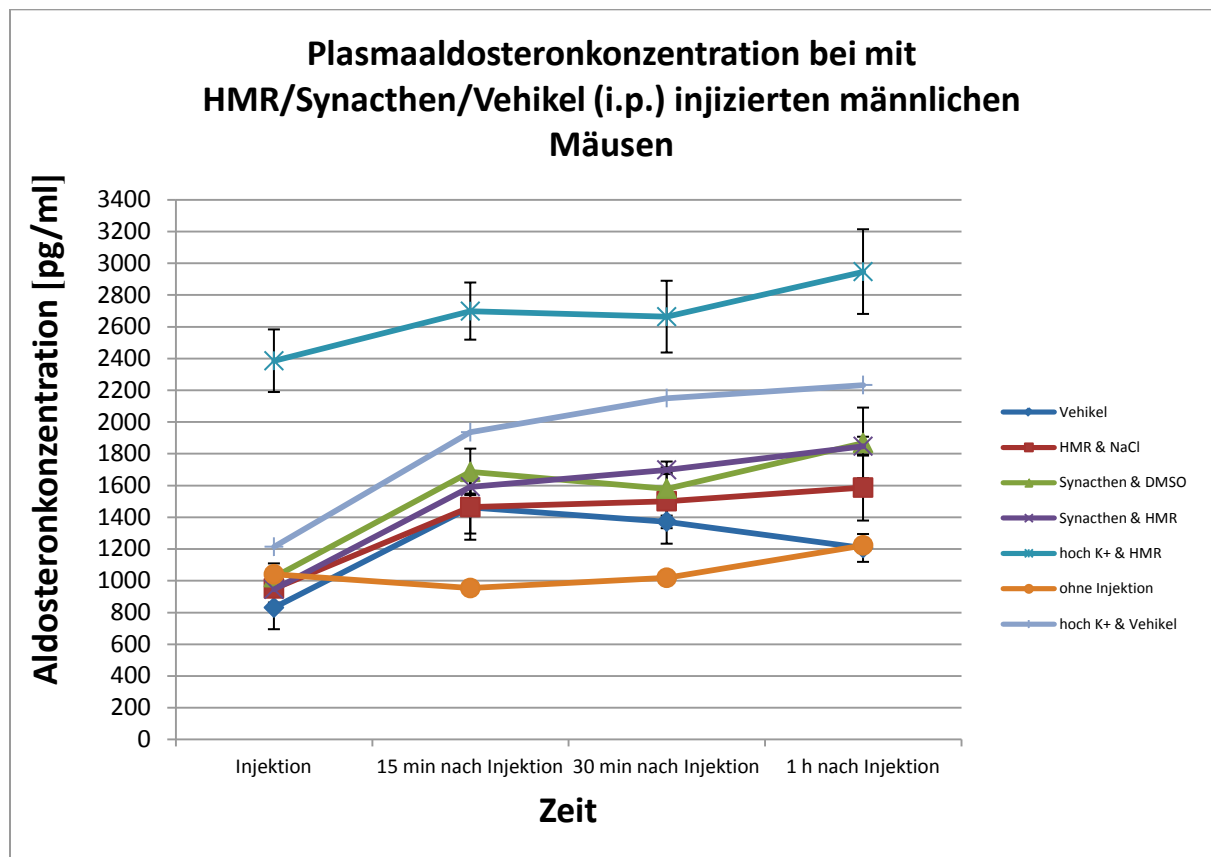
Die Intensitäten der Kcnma1-Banden (Bande mit der Größe 135 kDa) im Westernblot wurden gemessen und auf β-Aktin (s.o.) normiert. Die relative Expression ist hier dargestellt. Die wildtyp Weibchen exprimieren mehr Kcnma1 als die *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen. n = 6.

Als Kcnma1 charakteristische Bande, wurde die Bande auf Höhe von 135 kDa analysiert. Dabei wurde ersichtlich, dass die *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen weniger Kcnma1-Kanäle exprimieren als die wildtyp Weibchen. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Realtime-PCR, wo die dezonierten *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen mehr KCNMA1-mRNA produzierten als die wt Weibchen.

#### 4.5. In-vivo Einfluss des KCNQ1-Blockers HMR 1556 auf die Aldosteronausschüttung

Die Ergebnisse der Realtime-PCR und des Westernblots zeigen, dass *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen deutlich mehr *Kcnq1* exprimieren als die wt Weibchen. Die Untersuchungen mit Kastration und anschließender Testosterongabe bei männlichen wt Mäusen ergab eine Androgen-Abhängigkeit der *Kcnq1*-Expression bei männlichen Mäusen (siehe Realtime-PCR Ergebnisse für *Kcnq1*). Daher wurde die Hypothese formuliert, dass die geschlechtsspezifische Expression des *Kcnq1*-Kanals bei *Task1<sup>-/-</sup>* Mäusen für den unterschiedlichen Phänotyp bei Männchen und Weibchen eine wichtige Rolle spielt. In dem im Folgenden beschriebenen Versuch sollten die Auswirkungen einer pharmakologischen Hemmung des *Kcnq1*-Kanals auf die Aldosteronsekretion näher untersucht werden und dadurch Einblicke in die Funktion des *Kcnq1*-Kanals im Hinblick auf die Aldosteronproduktion gewonnen werden. Dazu wurden männliche Mäuse untersucht, die mit zwei unterschiedlichen Diäten ernährt wurden – eine Gruppe erhielt normales Trinkwasser, die andere Gruppe Trinkwasser mit einem erhöhten Kaliumchloridgehalt (300 mM). Mittels der Substanz HMR 1556 (*Kcnq1*-Blocker) sollte die Auswirkung einer *Kcnq1*-Inhibition auf die basale Aldosteronsekretion ermittelt werden. Zusätzlich wurden Synacthen (ACTH-Analogon) bzw. eine hoch-Kalium-Diät angewandt, welche normalerweise die Aldosteronproduktion erhöhen. So sollte der Effekt der *Kcnq1*-Blockade sowohl auf die basale Aldosteronproduktion sowie auf die mit hoch-Kalium-Diät oder Synacthen stimulierte Aldosteronsekretion untersucht werden. Bei jeder Plasmaentnahme wurde außerdem der Hämatokrit bestimmt, um erhöhte Aldosteronausschüttungen als Folge der Änderung des Volumenstatus auszuschließen. Der Hämatokrit nahm im Laufe des Experiments leicht ab (Werte hier nicht gezeigt), was wahrscheinlich durch den schnellen Flüssigkeitsausgleich und der im Verhältnis dazu langsamen Blutneubildung nach den Blutentnahmen bedingt war. Die Aldosteronwerte innerhalb einer Gruppe wurden für die einzelnen Messzeitpunkte gemittelt. Der Zeitpunkt der ersten Blutentnahme (Ausgangswert) fand 30 min nach Narkotisierung der Maus statt. Anschließend wurde die jeweilige Substanz intraperitoneal (i.p.) injiziert. 15 min, 30 min und 1 Stunde nach Injektion erfolgten weitere Blutentnahmen. Die Gruppe „Vehikel“ erhielt anstatt der Wirkstoffe nur deren

Lösungsmittel NaCl und DMSO. Das Vehikel für HMR war DMSO, das für Synacthen NaCl. Die zu allen Zeitpunkten höchsten Aldosteronkonzentrationen fanden sich bei der Mausgruppe, die eine hoch-Kalium-Diät erhalten hatte und den Kcnq1-Blocker HMR injiziert bekam (1 h nach Injektion:  $2947 \pm 267$  pg/ml,  $n = 6$ ). Den zweithöchsten Plasmaaldosteronwert zeigte die Maus, die ebenfalls eine hoch-Kalium-Diät erhalten hatte, jedoch als Injektion das Vehikel verabreicht bekam (1 h nach Injektion:  $2233$  pg/ml,  $n = 1$ ). In abnehmender Konzentration folgten die weiteren Gruppen: „Synacthen & DMSO“ (1 h nach Injektion:  $1868 \pm 222$  pg/ml,  $n = 6$ ), „Synacthen & HMR“ (1 h nach Injektion:  $1847 \pm 59$  pg/ml,  $n = 5$ ), dann „HMR & NaCl“ (1 h nach Injektion:  $1587 \pm 208$  pg/ml,  $n = 6$ ), und die beiden Gruppen „keine Injektion“ (1 h nach Injektion:  $1223$  pg/ml,  $n = 1$ ) und „Vehikel“ (1 h nach Injektion:  $1206 \pm 88$  pg/ml,  $n = 5$ ).



**Abbildung 26: Darstellung der gemittelten Plasmaaldosteronkonzentrationen der unterschiedlichen Mausgruppen in Abhängigkeit von den injizierten Substanzen und der Diät.**

(HMR & NaCl, Synacthen & DMSO, Synacthen & HMR, hoch K<sup>+</sup> & HMR, hoch K<sup>+</sup> & Vehikel; „Vehikel“ und „ohne Injektion“ als Kontrolle). i.p. = intraperitoneal. Zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme waren die Mäuse bereits 30 min narkotisiert. Direkt nach

der ersten Blutentnahme erfolgte die i.p. Injektion der jeweiligen Substanz. Zweite Blutentnahme: 15 min nach Injektion der jeweiligen Substanz. Dritte Blutentnahme: 30 min nach Injektion der Substanz. Vierte Blutentnahme: 1 Stunde nach Injektion. Zum Zeitpunkt der letzten Blutentnahme fanden sich die höchsten Aldosteronkonzentrationen bei der Mausgruppe, die eine hoch-Kalium-Diät erhalten hatte und den Kcnq1-Blocker HMR injiziert bekam (n = 6). Den zweithöchsten Plasmaaldosteronwert zeigte die Maus, die ebenfalls eine hoch-Kalium-Diät erhalten hatte, jedoch als Injektion das Vehikel erhielt (n = 1). In abnehmender Konzentration folgten: die Gruppen mit Synacthen & DMSO (n = 6), Synacthen & HMR (n = 5), HMR & NaCl (n = 6), und die beiden Gruppen „keine Injektion“ (n = 1) und „Vehikel“ (n = 5).  $n_{\text{gesamt}} = 30$ .

Allein durch den Effekt der Narkose kam es im Verlauf von einer Stunde zu einem Anstieg der Aldosteronkonzentration um 183 pg/ml. Der alleinige Effekt der Injektion (Vehikelgruppe) führte im Verlauf von einer Stunde zu einem Anstieg der Aldosteronkonzentration um 375 pg/ml. Die höchste Aldosteronkonzentration war bei dieser Gruppe jedoch, im Vergleich zu allen anderen Mausgruppen, bereits nach 15 min erreicht, sie viel im Verlauf wieder ab. Somit führt die Injektion an sich, unabhängig von der injizierten Substanz, zu einem initial schnellen Anstieg der Aldosteronkonzentration, die im Verlauf wieder abfällt. Der 1-Stundenwert ist also für die jeweilige Wirkung des injizierten Wirkstoffes aussagekräftiger als die vorherigen Zeitpunkte. Allerdings macht sich der alleinige Narkoseeffekt auch erst im späteren Verlauf bemerkbar. Bei der Maus mit vorangegangener hoch-Kalium-Diät und anschließender Vehikel-Injektion stieg die Aldosteronkonzentration nach 1 Stunde sogar um 1019 pg/ml an. Mit diesem hohen Anstieg der Aldosteronkonzentration ist sie die „Gruppe“ mit dem größten Effekt auf den 1-Stundenwert. Aufgrund der kleinen Versuchstierzahl (n = 1) ist dieser Wert jedoch schlecht verwertbar.

Bei den Mäusen, welche einen Wirkstoff injiziert bekamen, kam es ebenfalls zu einem Anstieg der Aldosteronkonzentration.

#### 4.5.1. Der Einfluss von Synacthen auf die Aldosteronkonzentration

---

Als ACTH-Analogen wirkt Synacthen durch einen Anstieg von cAMP in der Zelle, der wiederum eine intrazelluläre Kalziumfreisetzung bewirkt. Diese hingegen führt über eine Öffnung kalziumabhängiger Kalziumkanäle durch weiteren Einstrom von Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) zur Depolarisation und folglich über weitere Signalkaskaden zur Aldosteronfreisetzung (siehe Einleitung). Es gibt auch Hinweise darauf, dass Synacthen außerdem über eine Hemmung von Kaliumkanälen zur Depolarisation führt. In der

Gruppe der Mäuse, welche Synacthen injiziert bekam, kam es im Verlauf von einer Stunde nach Injektion zu einem Anstieg der Aldosteronkonzentration um 846 pg/ml. Auch prozentual gesehen, zeigt die Gruppe eine hohe Steigung (+ 82 %). Mit einer Zunahme um 901 pg/ml lag die Gruppe der Mäuse, die sowohl Synacthen als auch HMR bekamen bei sowohl der absoluten als auch der prozentualen (+ 95 %) Aldosteronzunahme an erster Stelle.

#### 4.5.2. Der Einfluss von HMR auf die Aldosteronkonzentration von normal-Diät und hoch-Kalium-Diät Mäusen

---

Es ist bekannt, dass die Kaliumkonzentration im Blut große Auswirkungen auf die Aldosteronfreisetzung hat; je höher das Plasmakalium, umso höher die Aldosteronausschüttung. Die erhöhte Aldosteronkonzentration führt zu einer Kaliumausscheidung, was der Hyperkaliämie entgegenwirkt. Auch in diesem Experiment wurden die höchsten Aldosteronwerte bei Mäusen mit hoch-Kaliumdiät erreicht (2385 pg/ml). Die anschließende Gabe von HMR ließ den Aldosteronwert um eine Konzentration von 562 pg/ml ansteigen. Prozentual gesehen war dies eine relativ kleine Änderung (+ 25 %), die neben den Kontrollmäusen ohne Injektion (+ 18 %) die geringste Änderung zeigte. Allerdings lässt sich diese geringe Steigerung dadurch erklären, dass die Ausgangskonzentration sehr hoch war – die Aldosteronsynthese kann durch die HMR-Gabe nur gering gesteigert werden, da diese irgendwann „erschöpft“ ist. In absoluten Zahlen gesehen, liegt diese Gruppe mit einem Anstieg von 562 pg/ml jedoch knapp unter der Gruppe mit Normaldiät und HMR-Injektion. Betrachtet man die Mäuse, die unter normaler Diät HMR erhielten, so zeigt sich ein wesentlich niedrigerer Aldosteronausgangswert (950 pg/ml), die prozentuale Steigerung steht mit 67 % an viert-höchster Stelle. Der Anstieg des Aldosterons lag mit 636 pg/ml knapp unter der Wirkung der Synacthen-Injektion (846 pg/ml). Den unter den Mausgruppen mit Wirkstoffinjektion erwartungsgemäß höchsten Anstieg in der Aldosteronkonzentration bot die Gruppe mit HMR- und Synacthen-Injektion. Hier kam es zu einem Anstieg um 901 pg/ml. Insgesamt lässt sich anhand dieser Daten schlussfolgern, dass die Kcnq1-Blockade durch HMR einen steigernden Effekt auf die Plasmaaldosteronkonzentration



hat, obwohl dieser nicht so stark ausgeprägt ist wie bei Synacthenapplikation. In Kombination mit der Synacthengabe kommt es jedoch durch HMR zu einem noch stärker ausgeprägten Anstieg der Plasmaaldosteronkonzentration. Bei jedoch bereits basal hoher Aldosteronsekretion (z.B. unter hoch-K<sup>+</sup>-Diät), ist der Effekt der Kcnq1-Blockade (durch HMR) auf den Aldosteronkonzentrationsanstieg relativ gering ausgeprägt.

## 5. Diskussion

---

Zur Regulation des Elektrolythaushaltes und des Blutdruckes stellt Aldosteron eines der wichtigsten Hormone dar. Verschiebungen, insbesondere im Natrium- und Kaliumhaushalt, können zu Änderungen der zellulären Membranpotentiale und deren Erregbarkeit führen und somit potentiell lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen verursachen. Unphysiologische Mengen an Aldosteron wirken zudem am Herzen und den Gefäßen profibrotisch und haben somit eine Compliancemindeung des kardiovaskulären Systems zur Folge. Hinzu kommen die direkten negativen Einflüsse des durch einen Hyperaldosteronismus bedingten arteriellen Hypertonus.

Die Aldosteronfreisetzung in den Zona glomerulosa Zellen der Nebennierenrinde hängt dabei maßgeblich von der Kaliumleitfähigkeit dieser Zellen ab. Besondere Wichtigkeit wird den TASK-Kanälen 1 und 3 sowie dem maxiK/KCNMA1-Kanal beigemessen. Die TASK-Kanäle gehören zu den Leckkanälen und bewirken einen Ruhemembranpotential-stabilisierenden Kaliumausstrom aus der Zelle. In Zona glomerulosa-Zellen ist TASK3 zwar in größeren Mengen vorhanden als TASK1, aber der TASK1 Kanal scheint nach bisherigem Kenntnisstand bedeutsamer für die physiologische Membranrepolarisation zu sein (12). So zeigten sich bei diesem unter Angiotensin II-Einfluss deutlich stärkere Absenkungen im Elektrolytenstrom (75 %) als bei dem TASK3 Kanal (20%) (80). Liegt an diesen Kanälen ein Defekt vor, der ihre Funktionstüchtigkeit aufhebt, ist die Regulation der Aldosteronausschüttung gestört. Bei *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen (11) und *Task1<sup>-/-</sup>/Task3<sup>-/-</sup>* Mäusen (73) sowie bei neonatalen *Task3<sup>-/-</sup>* Mäusen (8;81) konnte ein Hyperaldosteronismus mit salzsensitiver Hypertonie beobachtet werden. Die Lokalisation der Aldosteronsynthese ist bei adulten Weibchen von dem Kanal Task1 abhängig, bei Männchen jedoch nicht. Zudem zeigen *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen einen Hyperaldosteronismus, der bei Männchen so nicht vorhanden ist (11). In dieser Arbeit wurden *Task1<sup>-/-</sup>* Mäuse auf geschlechtsabhängige Unterschiede in der Expression weiterer Kaliumkanäle untersucht, um bei Männchen potentiell kompensatorisch fungierende Kaliumkanäle ausfindig zu machen. Dabei haben sich die Kanäle Task3 und Trek1 sowie die Kcnq1-Untereinheit Kcne4 als besonders vielversprechend herausgestellt möglicherweise zu einer Kompensation eines primären

Hyperaldosteronismus und der Dezonierung der Aldosteronsynthese in die Zona fasciculata bei *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen beizutragen.

### 5.1. Hyperaldosteronismus und Dezonierung der Aldosteronsynthese bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen

---

In früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen ein primärer Hyperaldosteronismus gefunden, der Ursache einer arteriellen Hypertonie war und sich durch Dexamethasongabe erfolgreich therapieren ließ (11). Eine dabei erniedrigte Herzfrequenz der *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen wurde als kompensatorisch betrachtet und machte eine erhöhte Sympathikusaktivität als Ursache für den Hypertonus eher unwahrscheinlich. Die arterielle Hypertonie bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen normalisierte sich nach Gabe des Mineralokortikoidrezeptorantagonisten Canrenoat. Dies war ein weiterer Hinweis darauf, dass der erhöhte Blutdruck durch das Aldosteron (ein Mineralokortikoid) verursacht wurde. Die *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen zeigten zudem eine Hypokaliämie unter Normaldiät und eine mangelhafte Anpassung der Aldosteronsekretion sowohl unter Hochkalium- als auch Niedrigkaliumdiät. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aldosteronmessungen zeigte sich ebenfalls eine deutliche Tendenz der *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen zum Hyperaldosteronismus, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Dies lag vermutlich daran, dass zum einen die Streubreite der Aldosteronkonzentrationswerte bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen sehr groß war. Zum anderen war die Anzahl der Versuchstiere sehr klein (n = 10).

Die mRNA-Expressionsmenge der Aldosteronsynthese (Cyp11b2) war bei dezonierten *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen signifikant höher als bei wildtyp Weibchen. Dies spricht dafür, dass die erhöhten Aldosteronwerte v.a. durch eine höhere Enzymaktivität hervorgerufen werden. Außerdem exprimierten die zonierten *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen tendenziell weniger Cyp11b2 als die wildtyp Weibchen was für eine ausreichende Kompensation sprechen würde (nicht signifikant). In der Gruppe der Männchen exprimierten die *Task1*<sup>-/-</sup> Mäuse nahezu gleiche Mengen Cyp11b2 wie die wildtyp Mäuse. Scheinbar unterdrückt bei Weibchen unter normalen Bedingungen *Task1* die Aldosteronsyntheseexpression in der Zona fasciculata.

Sowohl das Enzym Cyp11b1 (Heitzmann *et al.*) als auch dessen Produkt Corticosteron (Bielohuby *et al.*) sind bei Weibchen höher exprimiert als bei Männchen (11;77). Auch bei den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten ließ sich bei Weibchen eine erhöhte Cyp11b1-Expression nachweisen. Dies galt sowohl für die wildtyp Weibchen im Vergleich zu den wildtyp Männchen als auch für die *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen im Vergleich zu den *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen. Insbesondere zeigte sich die erhöhte Cyp11b1-Expression in der Gruppe der zonierten *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen im Vergleich zu den *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen. Dabei lagen die Expressionsmengen von zonierten *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen und wildtyp Weibchen auf ungefähr gleicher Höhe. Möglicherweise spielt Cyp11b1 bei den zonierten *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen eine Rolle für die Kompensation des *Task1*-Verlustes. Oder die dezonierte *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen exprimieren aufgrund eines negativen Feedbackmechanismus durch die erhöhten Aldosteronwerte weniger Cyp11b1. Corticosteronmessungen bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen zeigten bisher unauffällige Befunde (14). Interessant wäre ein Vergleich der Corticosteronwerte zwischen den zonierten und dezonierten weiblichen *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen in dieser Arbeit gewesen. Daten einer Publikation unserer Arbeitsgruppe sprechen dafür, dass in neugeborenen *Task3*<sup>-/-</sup> Mäusen ebenfalls ein Hyperaldosteronismus, sowie eine erhöhte Corticosteron- und Progesteronkonzentration vorliegen (81): Die jungen *Task3*<sup>-/-</sup> Mäuse besaßen keine erhöhten Cyp11b1-Werte, jedoch erhöhte Konzentrationen an Progesteron, welches als Substrat für die Produktion von Corticosteron und Aldosteron dient.

In den Experimenten dieser Arbeit konnte die Beobachtung, dass *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen eine dezonierte Aldosteronsynthese besitzen, bestätigt werden. Jedoch war dies nicht bei allen *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen der Fall. Mögliche Ursachen dafür könnten Altersunterschiede oder unterschiedliche Kompensationsmechanismen sein. Plasmaaldosteronwerte zeigten sich bei dezonierten Mäusen tendenziell erhöht, was für einen generellen Zusammenhang zwischen Dezonierung und Aldosteronproduktion spricht. So war im Plasma der Maus mit der größten Dezonierung (NN6, siehe Kapitel „Ergebnisse“) die höchste Aldosteronkonzentration nachweisbar. Es scheint unterschiedliche Grade der Enzymexpression bei den *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen zu geben. Einige *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen waren korrekt zoniert oder übergangszoniert, d.h. Cyp11b2 war sowohl in der Zona glomerulosa als auch in der Zona fasciculata nachweisbar.

Zur Differenzierung zwischen einer funktionellen Zonierung und lediglich einer Veränderung der Cyp11b2-Expressionslokalisation, wurde der Marker *dab2* verwendet, der nur ausdifferenzierte Zona glomerulosa Zellen anfärbt (82). Somit war eine Unterscheidung zwischen dezonierten Zona glomerulosa Zellen und regulär vorhandenen Zona fasciculata Zellen mit zusätzlicher Cyp11b2-Expression möglich. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich hierbei eine leichte Verbreiterung der Zona glomerulosa bei dezonierten *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen. Dies deutet darauf hin, dass eine vermehrte Proliferation von ZG-Zellen in der Zona glomerulosa selbst stattfindet. Denkbar wäre jedoch auch, dass die Zellen der äußersten Zone nach innen wandern und die Expression des Enzyms Cyp11b2 beibehalten. Dies würde auch die Entwicklung von Übergangszonierungen erklären. Die Zellen der dezonierten *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen, welche Cyp11b2 fehlerhaft in der Zona fasciculata exprimierten, zeigten jedoch zum größten Teil keine *dab2*-Expression. Entweder handelt es sich also um tatsächliche Zona fasciculata Zellen oder die migrierten Zona glomerulosa Zellen verloren im Verlauf ihre Zona glomerulosa Eigenschaften. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei neugeborenen *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen gemacht werden. Experimente der Arbeitsgruppe zeigten, dass diese am ersten postpartalen Tag normal zoniert waren und innerhalb einer Woche in die Dezonierung übergingen (14). Die hohe Aldosteronproduktion in der Zona fasciculata könnte durch einen negativen Feedbackmechanismus dazu führen, dass die Aldosteronsynthese in der Zona glomerulosa nicht mehr exprimiert wird.

Versuche mit kastrierten männlichen Mäusen und jungen *Task1<sup>-/-</sup>* Mäusen (14) zeigen konform mit den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten, dass die Zonierung der Aldosteronsynthese nicht nur von dem Kaliumkanal Task1 abhängig ist, sondern auch vom Geschlecht und dem Alter. Junge *Task1<sup>-/-</sup>* Mäuse vor der Pubertät zeigten in beiden Geschlechtern eine falsch lokalisierte Aldosteronsynthese. Dieser Effekt hob sich jedoch bei *Task1<sup>-/-</sup>* Männchen nach der Pubertät auf (14). Desweiteren führte eine Testosterongabe bei *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen zu einer Rezonierung und eine Kastration bei *Task1<sup>-/-</sup>* Männchen zur Dezonierung von Cyp11b2 (9;11), sodass Testosteron diesbezüglich als wichtiger Faktor angesehen werden kann.

Als Testosteron-abhängig exprimierten und möglicherweise für den *Task1*-Verlust kompensierend wirkenden Kanal vermutete man den *Task3* Kanal, denn dieser ist bei adulten Männchen in größerer Anzahl vorhanden als bei adulten Weibchen und außerdem bei jungen Mäusen sehr gering ausgeprägt (11). Doch die Arbeiten von Davies an der Doppelknockoutmaus *Task1*<sup>-/-</sup>/*Task3*<sup>-/-</sup> zeigten zwar einen primären Hyperaldosteronismus und eine fehlende Aldosteronregulation bei hoch-Natriumdiät, aber die Mäuse waren normal zoniert (73). Versuche mit adulten *Task3*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten zwar einen Hyperaldosteronismus unter hoch-Na<sup>+</sup>-Diät, doch auch bei diesem Genotyp konnte keine Dezonierung von *Cyp11b2* gefunden werden (8). *Task3* ist also u.a. essentiell für die Regulation der Aldosteronsekretion, jedoch nicht der einzig wichtige Faktor für die Lokalisation der Aldosteronsynthese. Es ergab sich also die Frage nach weiteren Kanälen, die in *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen ebenfalls den *Task1*-Kanal zumindest teilweise funktionell ersetzen könnten.

## 5.2. Dem Hyperaldosteronismus und der Dezonierung der Aldosteronsynthese entgegenwirkende Kaliumkanäle

Mittels PCR, Western-Blot und Immunfluoreszenzfärbungen sollten Unterschiede in Kaliumkanalexpressionen zwischen den Geschlechtern und den *Task1*-Genotypen untersucht werden um Hinweise auf mögliche kompensatorische Kanäle der *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen zu finden. Durch weitere Mitglieder der Arbeitsgruppe (Dr. Bandulik und Dr. Penton-Ribas) wurde hierzu der Effekt von Kastration und Testosterongabe auf die Expression verschiedener Kaliumkanäle untersucht.

Die Expression des *Task1*-Kanals in Nebennieren von männlichen wildtyp Mäusen war weder kastrations- noch testosteronabhängig. Der Kanal *Task2* zeigte keine *Task1*- oder geschlechtsabhängige Expression.

Die Expression des maxiK Kanals (*Kcnma1*) nahm bei wildtyp Männchen nach Kastration ab und konnte durch Testosterongabe nicht mehr angehoben werden. In dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass wildtyp Männchen eine höhere Expression an maxiK-Kanälen zeigten als wildtyp Weibchen und *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen diesbezüglich eine ähnlich hohe Expression wie *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen besaßen. Da der

maxiK Kanal die Repolarisation begünstigt könnte man vermuten, dass er bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen aufgrund eines Kompensationsversuches höher exprimiert wird als bei wildtyp Weibchen, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Da er bei *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen nicht höher exprimiert ist als bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen kommt er als *Task1*-kompensierender Kanal auch eher nicht in Frage. Ein wichtiger Aspekt ist zudem die Möglichkeit einer Aktivierung auf nicht-transkriptioneller Ebene. Da der maxiK-Kanal spannungsabhängig ist und durch Kalzium aktiviert wird, könnte es bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen, welche ein höheres (weniger negatives) Ruhemembranpotential aufweisen, durch häufigere Depolarisationen mit nachfolgendem intrazellulärem Kalziumanstieg zu einer erhöhten Aktivität dieses Kanals kommen. Dabei ist für das Ausschleusen von Calcium durch Natrium-Calcium-Austauscher ein hyperpolarisiertes Membranpotential notwendig. Entgegengesetzt zu den realtime-PCR-Ergebnissen zeigte sich im Westernblot-Verfahren die *Kcnma1*-Expression bei den wildtyp Weibchen höher als bei den *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen. Möglicherweise kam es nach initial erhöhter Produktion des maxiK-Kanals zu einem vermehrten Abbau. Ggf. wäre dies eine Erklärung für die mangelnde Anpassungsfähigkeit der *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen an den *Task1*-Verlust sein. Hilfreich wäre an dieser Stelle auch ein Vergleich zu der *Kcnma1*-Menge von männlichen Mäusen im Westernblot-Verfahren (in dieser Arbeit wurden nur weibliche Mäuse untersucht).

Vielversprechend waren zunächst die Daten zu KCNQ1, der auch in der Nebenniere des Menschen exprimiert wird (42;43). In Aldosteron-produzierenden Adenomen war die KCNQ1-mRNA-Expression nicht erhöht (83). Die Menge des *Kcnq1*-Kanals konnte bei wildtyp Männchen durch Kastration gesenkt werden und durch Testosterongabe wieder angehoben werden. Wildtyp Männchen exprimierten außerdem mehr *Kcnq1* als wildtyp Weibchen. Der *Task1*-Knockout führte in dieser Versuchsreihe bei weiblichen Mäusen zu einer signifikanten Erhöhung der *Kcnq1*-Expression, die sowohl in der realtime-PCR als auch im Westernblot nachweisbar war. Im direkten Vergleich zwischen den Geschlechtern zeigte sich bei den *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen sogar eine stärkere Expression des *Kcnq1*-Kanals bei den weiblichen Tieren (nicht signifikant). Dieser Anstieg könnte ebenfalls als (nicht ausreichender) Kompensationsversuch bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen interpretiert werden. In Immunfluoreszenzfärbungen zeigte sich die *Kcnq1*-

Expression bei weiblichen und männlichen Wildtypmäusen eher auf die Zona reticularis beschränkt während sie sich bei weiblichen und männlichen *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen v.a. in der Zona fasciculata zeigte. Diese Flexibilität hinsichtlich der Nebennierenrindenstruktur könnte ebenfalls eine kompensatorische Reaktion sein. An dieser Stelle sei noch erwähnt, dass es Daten zu einer *Kcne1*<sup>-/-</sup> Maus gibt. Mutationen in der KCNE1-Untereinheit spielen v.a. bei dem Long-QT-Syndrom des Herzens eine wichtige Rolle. *Kcne1*<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen ebenfalls einen Hyperaldosteronismus mit Hypokaliämie auf (42). Jedoch war, im Gegensatz zu *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen, die Reninkonzentration bei diesen Mäusen erhöht, was gegen eine primäre Form des Hyperaldosteronismus spricht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ganztierversuche zu einer Kcnq1-Blockade mittels HMR durchgeführt. Durch eine Blockierung des Kcnq1 Kanals konnte die Plasmaaldosteronkonzentration zwar angehoben werden, jedoch fiel diese geringer aus als durch Synacthengabe (ACTH-Analogen).

Interessante Ergebnisse erbrachten die Analysen der Kcnq1- $\beta$ -Untereinheiten *Kcne3* und *Kcne4*. Die Untereinheiten bestimmen wesentlich die Eigenschaften des Kcnq1-Stroms (32). *Kcne3* führt zu einer raschen Aktivierung und Inaktivierung des Kanals und war sowohl bei *Task1*<sup>-/-</sup> als auch bei wildtyp Weibchen signifikant stärker exprimiert als bei den jeweiligen Männchen. Die *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen besaßen eine größere Menge *Kcne3* als die Wildtypen. Es wäre denkbar, dass diese Untereinheit durch die Veränderung des Kcnq1-Stroms bei Männchen zur Kompensation von *Task1* beitragen könnte. Eine raschere Aktivierung und Inaktivierung des Kcnq1-Kanals könnte zu schnelleren Antworten auf inhibierende und aktivierende Faktoren führen und eher kurz dauernde Aldosteronpeaks begünstigen als dauerhaft erhöhte Aldosteronkonzentrationen. Dies würde eine bessere und schnellere Anpassungsfähigkeit des Membranpotentials bedeuten. Gegen die Kompensation durch diesen Kanal sprechen jedoch höhere Expressionsmengen bei Weibchen. Sie müssten auch bei Weibchen zu einer ausreichenden Kompensation führen und somit eine Dezonierung der Aldosteronsynthese bzw. einen Hyperaldosteronismus verhindern. Wenn man jedoch den relativen Anstieg vom Ausgangswert (wildtyp) der jeweiligen *Task1*<sup>-/-</sup> Mäuse betrachtet, könnte der mangelnde Anstieg bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen im Vergleich zu Männchen eine mögliche Erklärung für die Dezonierung liefern.



Auch die Untereinheit Kcne4, die den Kcnq1-Strom unter physiologischen Bedingungen hemmt und ihn bei Spannungen ab 50 mV aktiviert (39), lieferte interessante Ergebnisse. Bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen konnten höhere Konzentrationen der Kcne4-Untereinheit nachgewiesen werden als in wildtyp Weibchen und *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen. Die *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen hingegen besaßen tendenziell weniger Kcne4 als die wildtyp Männchen, jedoch auf nicht signifikantem Niveau. Da die Kcne4-Untereinheit den Kcnq1-Strom hemmt, würde dies im physiologischen Bereich eine Inaktivierung der Kcnq1-Kanäle bedeuten. Eine hohe Kcne4-Expression würde durch Hemmung des Kcnq1-Stroms eine Kompensation weiter erschweren und das Ruhemembranpotential der Zellen eher in Richtung Depolarisation verschieben. Somit könnte die mangelnde Fähigkeit der *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen, den *Task1*-Knockout zu kompensieren evtl. durch eine erhöhte Kcne4-Expression erklärt werden. Nachdem sich einige Kcnq1-Untereinheiten als vielversprechend für eine *Task1*-Kompensation zeigten, wäre es interessant die Lokalisation dieser Untereinheiten in der Nebenniere zu untersuchen (z.B. mit Immunfluoreszenzfärbungen). Eventuell könnten so Zusammenhänge mit der Delokalisation des Enzyms Cyp11b2 gefunden werden. Im Hinblick auf die Auswirkung einer Kcnq1-Inhibition auf die Aldosteronsynthese ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse. Hier könnten durch die unterschiedlichen Bedingungen zu viele Variablen und Fehler in der Aldosteronmessung entstanden sein. Eine genauere Analyse des HMR-Effekts auf den Strom bzw. das Kalziumsignal der Zellen wäre interessant.

Innerhalb der Arbeitsgruppe konnten vor kurzem neue Erkenntnisse über die Funktionen des Task3-Kanals gewonnen werden (8;81). Adulte *Task3*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten unter Normalbedingungen weder eine Dezonierung der Aldosteronsynthese noch einen Hyperaldosteronismus. Jedoch war die Regulation der Aldosteronproduktion dennoch gestört. Unter Niedrig-Na<sup>+</sup>- und Hoch-K<sup>+</sup>-Diät, welche die Aldosteronproduktion normalerweise erhöhen, zeigten die *Task3*<sup>-/-</sup> Mäuse einen normalen Anstieg des Plasmaaldosterons. Eine Hoch-Na<sup>+</sup>- und Niedrig-K<sup>+</sup>-Diät konnte jedoch keine Reduktion des Plasmaaldosterons bewirken, sodass die adulten *Task3*<sup>-/-</sup> Mäuse im Schnitt einen um 10 mmHg erhöhten systolischen Blutdruck aufwiesen (8). Bei neonatalen *Task3*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte sich sogar ein Hyperaldosteronismus mit Erhöhungen von Corticosteron und Progesteron (81). Außerdem war bei den jungen *Task3*<sup>-/-</sup> Mäusen eine

Reninproduktion in der Zona fasciculata nachweisbar, die bei wt Mäusen und erwachsenen *Task3*<sup>-/-</sup> Mäusen nicht vorhanden war. Das Plasmarenin war jedoch normal. Bei den jungen Mäusen könnte daher das lokal produzierte Renin zum Hyperaldosteronismus geführt haben. Somit bewirkte das Fehlen von *Task3* eine Störung der normalen Aldosteronproduktion sowie eine Störung der anderen beiden Zonen der Nebenniere. Diese Beobachtung konnte vor kurzem auch eine andere Arbeitsgruppe bestätigen, diese postulierte aber als Ursache für den Hypertonus eine Angiotensin II-Hypersensitivität (10). In unseren Messungen konnte jedoch ein 3-fach erhöhter Aldosteron-Renin-Quotient unter Standard- und Hoch-Na<sup>+</sup>-Diät gemessen werden, der eher auf eine autonome Komponente des Hyperaldosteronismus schließen lässt (8). Interessant wäre es, auch die *Task1*<sup>-/-</sup> Mäuse auf Reninproduktion in der Nebenniere hin zu untersuchen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Realtime-PCR-Ergebnisse von *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten bei Männchen wesentlich größere Mengen an *Task3* als bei Weibchen. Außerdem war in *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen weniger *Task3* als in wildtyp Weibchen nachweisbar. Gleichzeitig zeigten die Immunfluoreszenzfärbungen bei Männchen eine v.a. Zona fasciculata-gebundene *Task3*-Expression, während bei Weibchen v.a. die Zona glomerulosa und Zona reticularis *Task3* exprimierten. Die Kombination aus verminderter *Task3*-Expression und fehlender *Task3*-Lokalisation in der Zona fasciculata könnte eine Erklärung für die Dezonierung der Aldostersonsynthese und den Hyperaldosteronismus bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen sein. Auch die Kastrationsergebnisse würden dafür sprechen, denn eine Kastration konnte die *Task3*-Expression deutlich vermindern und anschließende Testosterongabe sie wieder erhöhen. Die testosteronabhängige Expression von *Task3* schien eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Auswirkungen der *Task1*-Deletion auf Männchen und Weibchen zu sein. Dazu passen jedoch nicht die oben beschriebenen Erkenntnisse, dass *Task3*<sup>-/-</sup> Mäuse keine Dezonierung aufweisen. Auch die *Task1*<sup>-/-</sup>/*Task3*<sup>-/-</sup> Doppelknockoutmäuse zeigen zwar einen Hyperaldosteronismus, jedoch keine Dezonierung der Aldostersonsynthese (73). Daher können *Task1* und *Task3* nicht allein entscheidend für die Zonierung der *Cyp11b2* sein.

Der ebenfalls für die Hintergrundleitfähigkeit wichtige *Trek1*-Kanal, der nicht nur in bovinen sondern auch in Nebennieren von Ratten und Mäusen vorkommt, zeigte

ebenfalls interessante Ergebnisse. Trek1 ist wie die Task-Kanäle essentiell für das Ruhemembranpotential der Zelle. Das Membranpotential wiederum ist entscheidend für die Aldosteronsekretion. In Kastrationsexperimenten von Dr. Penton-Ribas und Dr. Bandulik zeigten die männlichen Mäuse nach ihrer Kastration eine erhöhte Trek1-mRNA-Expression. Anschließende Testosterongabe konnte die Trek1-Menge nicht vollständig normalisieren. Ähnlich wie bei den Realtime-PCR-Ergebnissen von Task3, war Trek1 bei Männchen unabhängig vom *Task1*-Genotyp in größeren Mengen exprimiert als bei Weibchen. Auch hier könnte man vermuten, dass der Mangel an Trek1 bei Weibchen den Hyperaldosteronismus und die Dezonierung von Cyp11b2 bewirkt, während die Männchen Trek1 als kompensierenden Kanal für Task1 besitzen. Ein entsprechender geschlechtsabhängiger Phänotyp bei *Trek1*<sup>-/-</sup> Mäusen ist allerdings nicht bekannt. In Experimenten mit einer Hemmung von Trek1 in NCI-H295R Zellen zeigte sich eine Depolarisation (84). In humanen Nebennieren konnten in Zona fasciculata Zellen TREK1-Ströme nachgewiesen werden. Es konnte außerdem eine Inaktivierung des Kanals durch ACTH und Angiotensin II mit folglich Cortisolsynthese und -ausschüttung beobachtet werden (27). Enyeart et al. konnten TREK1 als einen der wichtigsten Leck-Kanäle in der humanen Zona fasciculata identifizieren. Damit ist TREK1 vermutlich einer der wichtigen Kanäle im Hinblick auf die Cortisolsynthese. Daten zu *Trek1*<sup>-/-</sup> Mäusen liegen hierzu noch nicht vor. Trek1 wird also geschlechtsabhängig exprimiert, die Menge ist jedoch nicht allein testosteronabhängig. Sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen änderte der *Task1*-knockout nichts an der Trek1-Expression. Dennoch könnte der Trek1-Kanal bei Männchen, insbesondere in Kombination mit Task3, als protektiver Faktor für einen Hyperaldosteronismus fungieren.

Denkbar wäre, dass die Kombination aus den Kanälen Task3 und Trek1 sowie die Untereinheit Kcne4 des Kcnq1-Kanals bei den *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen einen Hyperaldosteronismus und die Dezonierung des Cyp11b2-Enzyms verhindern. Weiterhin ist es jedoch unklar, wie diese geschlechtsabhängigen Unterschiede zustande kommen da die Expression der meisten Kalium-Kanäle sich durch Kastration zwar signifikant veränderte, eine anschließende Testosterongabe jedoch nur bei einem Teil der Kanäle die normale Expression wiederherstellen konnte. Weitere Versuche

bezüglich der Rolle von *Trek1* und *Kcne4* wären sinnvoll. Unklar ist auch, welche Rolle die Heterodimerbildung von *Task1* und *Task3* spielt. Aufgrund einer generell niedrigeren Expression von *Task3* durch weibliche Mäuse werden auch weniger funktionstüchtige Heterodimere gebildet, sodass ein zusätzlicher *Task1*-Verlust bei Weibchen zu Hyperaldosteronismus und zur Dezonierung der Aldosteronsynthese führen könnte. An dieser Stelle sei erwähnt, dass das Narkosegas Isofluran eine starke Wirkung auf die untersuchten K2P-Kanäle haben kann. Es gibt einige Studien, die über eine Hyperpolarisation von Zellen durch Aktivierung von K2P-Kanälen durch volatile Anästhetika berichten (84;85). Z.B. wird TREK1 durch volatile Anästhetika aktiviert und wirkt somit einer Membrandepolarisation entgegen. Dieser Effekt könnte zu einer Zustandsänderung der entnommenen Nebennieren führen und die Experimente bezüglich der Aldosteronkonzentration und der Depolarisation der Nebennierenzellen verfälschen. Da die Isofluorankonzentration zwischen den Tieren nicht verschieden war, müssten die Mäuse jedoch wenigstens untereinander vergleichbar sein. Außerdem reagiert das Gewebe von Mäusen und Ratten anders als das von Menschen, sodass nicht alle Ergebnisse übertragbar sind.

Es ist fraglich, ob die Auswirkungen des *Task1*-Knockouts auf die Regulation der Aldosteronproduktion bei Mäusen auch bei Menschen bestehen und in bestimmten Fällen für einen arteriellen Hypertonus verantwortlich gemacht werden können. Es gibt mehrere Gene, deren Mutationen als Ursache für einen primären Hyperaldosteronismus angesehen werden. Dazu gehören in Mausmodellen *Task1*, *Task3* sowie *Cry 1 & 2*. Bei Menschen mit Aldosteron-produzierenden Adenomen und unilateraler Hyperplasie spielten v.a. Mutationen in *KCNJ5* (86), *CACNA1D*, *CACNA1H* (87), *ATP1A1*, *ATP2B3* und *CTNNB1* (88) eine wichtige Rolle. Dabei zeigten sich Adenome mit *KCNJ5*-Mutationen v.a. bei weiblichen Patientinnen. Die Adenome hatten im Durchschnitt einen größeren Durchmesser und eine Zona fasciculata ähnliche Morphologie. Weiterhin konnte als Ursache für die Adenomentstehung ein Selektivitätsverlust für Kaliumionen ausgemacht werden (88). Einige Arbeiten konnten zeigen, dass TASK1 und TASK3 in menschlichen Nebennieren vorkommen und TASK1 der vorherrschende Kaliumkanal ist (61;84). Nogueira et al. konnten weiterhin herausfinden, dass in menschlichen H295R TASK1-Knockdownzellen, in denen die TASK1-Expression um 70-80% vermindert war,

das StAR-Protein um ein 2,5-faches erhöht war und das Aldosteron-produzierende Enzym CYP11B2 um ein 4-faches anstieg (61). Außerdem waren Pregnenolon, Aldosteron und intrazelluläres Kalzium erhöht. Das Enzym CYP11B1 zeigte keine Konzentrationsänderungen als Folge des Knockdowns. Es konnten auch hier depolarisierte Membranspannungen unter Ruhebedingungen gefunden werden. TASK1 schien außerdem der häufigste Kaliumkanal in den menschlichen Nebennieren zu sein, gefolgt von TREK1 (61). Weiterhin wurden sowohl gesunde Nebennieren als auch solche mit Aldosteron-produzierenden Adenomen auf Veränderungen in Kaliumkanalexpressionen untersucht. Es konnten jedoch keine Unterschiede detektiert werden. Dies spricht eher dagegen, dass ein Funktionsverlust von *TASK1* bei Menschen ebenfalls zu einem Hyperaldosteronismus führt. Allerdings wurden nur Gewebeproben mit Adenomen ohne Vorliegen einer bilateralen Hyperplasie untersucht. Ein *TASK1*-Verlust kann also dennoch eine Ursache für diese letztere Form sein; weitere Experimente wären nötig um dies zu beweisen. Eine andere Gruppe untersuchte die Auswirkungen von K2P-Kanalmodulatoren und einem TREK1-Inhibitor in menschlichem Gewebe. In beiden Fällen war eine Depolarisation nachweisbar. Eine Veränderung der Aldosteronproduktion nach K2P-Modulatorengebe konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (84). In einer Studie aus dem Jahr 2011 wurden 22 Patienten mit Conn-Syndrom auf Mutationen in Kaliumkanälen untersucht (49). Acht von diesen Patienten hatten verschiedene Mutationen auf dem *KCNJ5*-Gen, dessen Kanal sich nur in der Zona glomerulosa befindet. Die daraus resultierende chronische Erhöhung des intrazellulären Kalziums könnte wiederum die Zellproliferation und die Entwicklung eines Adenoms erklären. In den Genen *TREK1*, *TASK-1* und *TASK-3* konnten keine Mutationen gefunden werden, jedoch wurden auch in dieser Studie keine Patienten mit idiopathischem Hyperaldosteronismus untersucht. An dieser Stelle wäre es interessant, weitere Experimente durchzuführen, die Patienten mit der idiopathischen Form des Hyperaldosteronismus auf Mutationen im *TASK1*-Gen untersuchen.

### 5.3. Ausblick

---

Eine weitere Erklärung für die Kompensation bei *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen könnte der Wnt-Signalwegmodulator DKK3 (dickkopf3) liefern (89). Er hemmt die Wnt-Signalkaskade, welche eine wichtige Rolle sowohl bei der normalen embryonalen Entwicklung (Zellproliferation, -mobilität, und -differenzierung) als auch der Tumorigenese spielt (90;91). Der DKK3 hält vermutlich eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Nebenniere und der Aldosteronproduktion inne. DKK3 ist hauptsächlich in der Zona glomerulosa, aber auch in der Zona fasciculata von Mensch- und Mausnebennieren exprimiert (92). Außerdem hemmt es in Zellkulturen humaner Nebennierenzellen die Biosynthese von Aldosteron und Cortisol, während es die Expression des Enzyms CYP11B2 erhöht (93). Da Kalzium vermutlich die Induktion der DKK3-Transkription bewirkt, würde dies erklären, warum *Task1*<sup>-/-</sup> Mäuse erhöhte DKK3-Expressionen aufweisen (14;94). Die Zellen von *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen sind nämlich depolarisiert und über spannungsabhängige Kalziumkanäle kommt es wie bereits erwähnt zu einem Kalziumeinstrom. Doppelknockoutmännchen (*Task1*<sup>-/-</sup>/*Dkk3*<sup>-/-</sup>) zeigen erhöhte Aldosteronplasmakonzentrationen, ein erhöhtes Aldosteron/Renin-Verhältnis und erhöhte Cyp11b2-Werte (94). Eine Dezonierung der Aldosteronsynthese kam jedoch bei diesen Mäusen nicht vor. *Dkk3* kann folglich erklären, warum *Task1*<sup>-/-</sup> Männchen normale Aldosteronwerte haben, die Unterschiede in der Zonierung kann dieser Modulator jedoch nicht erklären. Bei *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen war *Dkk3* deutlich erhöht, wobei die Wnt-Signalkaskade unverändert blieb (94). Dies weist auf einen Wnt-unabhängigen Regulationsmechanismus des *Dkk3* hin. Weitere Experimente an humanem DKK3 in Nebennieren wären sicherlich aufschlussreich über dessen genauere Funktion in der Entstehung von Adenomen und primärem Hyperaldosternismus.

Mazhari et al. (77) entdeckten, dass bei jungen Mäusen zwischen 3 und 11 Wochen die Weibchen eine deutlich größere Zona fasciculata besaßen mit mehr Zellen als die Männchen. Während das Gewicht der Nebenniere, welches am meisten von der Größe der Zona fasciculata abhängt, bei Männchen zwischen der 7. Und 9. Woche um ein Viertel abnahm, blieb das Gewicht der weiblichen Nebennieren ab der 7. Woche konstant. Auch die Anzahl und Größe der Lipidtröpfchen, die in der Zona fasciculata

gespeichert werden waren bei Weibchen höher als bei Männchen. Auch diese Aspekte könnten bei der Entstehung eines Hyperaldosteronismus bei Delokalisation der Aldosteronsynthase und folglich der Deregulation der Aldosteronproduktion eine Rolle spielen.

Ein weiterer Aspekt stellt die X-Zone da, die bei Mäusen morphologisch die Zona reticularis ersetzt. Ihr Volumen war bei den 3 Wochen alten Männchen am höchsten und nahm mit der Zeit ab bis sie ab der 5. Woche nicht mehr nachweisbar war, während sie bei den Weibchen ab der 3. Woche wuchs. Diese Regression der X-Zone war durch Testosterongabe auch bei Weibchen induzierbar und tritt physiologischer Weise mit der ersten Schwangerschaft auf (77;95;96). Die Funktion der X-Zone ist noch nicht vollständig geklärt. Jedoch wäre es denkbar, dass sie bei der Entwicklung eines Hyperaldosteronismus bzw. einer Dezonierung der Aldosteronsynthase eine Rolle spielt.

## 6. Zusammenfassung

---

Bis zu 10% aller Patienten, die unter arterieller Hypertonie leiden, haben einen primären Hyperaldosteronismus. Zu den bluthochdruckinduzierten Folgen kommen in diesen Fällen die direkten negativen Einflüsse des Aldosterons (Linksherzhypertrophie, diastolische Dysfunktion, Elastizitätsverlust der Gefäße durch fibrotischen Umbau) hinzu und führen somit zu einer weiteren Erhöhung der Mortalität. Für die Regulation der Aldosteronproduktion spielen Kaliumkanäle wie TASK1, TASK3, TREK1, KCNQ1 und KCNMA1 eine wichtige Rolle. Abhängig von deren Leitfähigkeit und Aktivität wird die Plasmaaldosteronkonzentration über Kalziumsignalwege, Transkriptionsfaktoren und Regulatorproteine (z.B. StAR) beeinflusst. In vorhergehenden Versuchen wurde beobachtet, dass weibliche Mäuse mit fehlendem Task1-Kalium-Kanal (*Task1<sup>-/-</sup>*) im Gegensatz zu männlichen *Task1<sup>-/-</sup>* Mäusen einen Hyperaldosteronismus und eine Fehlzonierung der Aldosteronsynthese (Cyp11b2) ausbilden. Ziel dieser Arbeit war es, bei männlichen *Task1<sup>-/-</sup>* Mäusen Kanäle zu finden, die diesen Verlust möglicherweise kompensieren können.

Zur Phänotypisierung wurde zunächst das Plasmaaldosteron sowohl weiblicher und männlicher wildtyp als auch *Task1<sup>-/-</sup>* Mäuse gemessen. Hier zeigte sich ein nicht signifikanter Hyperaldosteronismus der *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen. Dieselben Tiere wurden mittels Immunfluoreszenzfärbungen der Nebennieren auf eine Dezonierung der Aldosteronsynthese hin untersucht. In der Gruppe der *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen gab es hier große Unterschiede in der Lokalisation der Aldosteronsynthese. Es zeigten sich zonierte, dezonierte und übergangszonierte Expressionsmuster. Bei den Männchen war die Aldosteronsynthese auf die Zona glomerulosa begrenzt. Es konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Plasmaaldosteronkonzentration und der Dezonierung der Aldosteronsynthese gefunden werden. Dabei zeigten *Task1<sup>-/-</sup>* Weibchen mit dezonierter Aldosteronsynthese höhere Aldosteronsynthese-Expressionen und die höchsten Plasmaaldosteronkonzentrationen.

Desweiteren wurden Realtime-PCR, Western-Blot und Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt um Unterschiede in den Expressionsmengen und -mustern der Kalium-Kanäle zwischen wildtyp und *Task1<sup>-/-</sup>* Männchen und Weibchen festzustellen.



Hinsichtlich der Kalium-Kanäle Task2, Kcnma1 und Kcnq1 mit seinen Untereinheiten Kcne1, Kcne2 und Kcne5 konnten in dieser Versuchsreihe hinsichtlich der Geschlechter keine signifikanten Unterschiede in der Gruppe der *Task1*<sup>-/-</sup> Mäuse gefunden werden. Als vielversprechend stellten sich jedoch die Kanäle Task3 (bilden Heterodimere mit Task1), Trek1 und die Kcnq1-Untereinheiten Kcne3 (schnelle Aktivierung und Inaktivierung des Kcnq1-Stroms) und Kcne4 (hemmende Wirkung auf den Kcnq1-Strom) heraus. RT-PCR und Westernblot-Versuch zeigten, dass *Task1*<sup>-/-</sup> Weibchen deutlich mehr (RT-PCR: ca. 1,5-fach) Kcnq1 produzieren als männliche *Task1*<sup>-/-</sup> Mäuse. Zugleich wurde jedoch auch – im Gegensatz zu den männlichen *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen – die hemmende Untereinheit Kcne4 überexprimiert. Männliche *Task1*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten im Vergleich zu den wildtyp Männchen eine signifikant gesteigerte mRNA-Produktion der Kcne3-Untereinheit. Unabhängig von den Subgruppen waren in der Versuchsreihe in männlichen Mäusen deutlich höhere Werte an Task3 und Trek1 nachweisbar. Der Task3-Kanal wurde von den Männchen dabei hauptsächlich in der Zona fasciculata exprimiert. Bei Weibchen war die Expression von Task3 schwächer und eher auf die Zona glomerulosa und die Zona reticularis beschränkt. Im Gegensatz zu männlichen Tieren wiesen weibliche *Task1*<sup>-/-</sup> Mäuse in der Zona fasciculata häufig eine fehllokalisierte Aldosteronsynthese auf. Eine lokale Unterdrückung der Aldosteronsyntheseexpression durch Task3 bei männlichen *Task1*<sup>-/-</sup> Mäusen ist daher denkbar. In vorhergehenden Studien konnte bereits veranschaulicht werden, dass der Task3-Kanal nicht allein für die Kompensation des Task1-Kanals verantwortlich sein kann. In dieser Versuchsreihe konnten diesbezüglich mit Trek1, Kcne3 und Kcne4 weitere Komponenten für einen tragfähigen Erklärungsansatz näher beleuchtet werden. In Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich, dass ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Kaliumkanälen, Signalwegen und Transkriptionsfaktoren für die spezifische Expression der Aldosteronsynthese notwendig ist. Weiterführende Studien werden notwendig sein, um dieses Zusammenspiel näher zu charakterisieren und eine mögliche Bedeutung für den Hyperaldosteronismus beim Menschen zu überprüfen.

## 7. Quellen

1. Keegan CE, Hammer GD. Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends Endocrinol.Metab* 2002 Jul;13(5):200-8.
  2. Keeney DS, Jenkins CM, Waterman MR. Developmentally regulated expression of adrenal 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 in the mouse embryo. *Endocrinology* 1995 Nov;136(11):4872-9.
  3. Andreis PG, Neri G, Nussdorfer GG. Effect of luteinizing hormone-releasing hormone on rat adrenocortical cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 1997 Sep;63(1-3):17-9.
  4. Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr.Rev.* 1997 Jun;18(3):378-403.
  5. Howard-Miller E. A transitory zone in the adrenal cortex which shows age and sex relationships. *Am.J.Anat.* 1927 Nov 1;40(2):251-93.
  6. Holmes PV, Dickson AD. X-zone degeneration in the adrenal glands of adult and immature female mice. *J.Anat.* 1971 Jan;108(Pt 1):159-68.
  7. Connell JM, Davies E. The new biology of aldosterone. *J.Endocrinol.* 2005 Jul;186(1):1-20.
  8. Penton D, Bandulik S, Schweda F, Haubs S, Tauber P, Reichold M, Dang CL, El WA, Budde T, Lesage F, et al. Task3 Potassium Channel Gene Invalidation Causes Low Renin and Salt-Sensitive Arterial Hypertension. *Endocrinology* 2012 Aug 9;153:4740-8.
  9. Bandulik S, Penton D, Barhanin J, Warth R. TASK1 and TASK3 potassium channels: determinants of aldosterone secretion and adrenocortical zonation. *Horm.Metab Res.* 2010 Jun;42(6):450-7.
-

10. Guagliardo NA, Yao J, Hu C, Schertz EM, Tyson DA, Carey RM, Bayliss DA, Barrett PQ. TASK-3 channel deletion in mice recapitulates low-renin essential hypertension. *Hypertension* 2012 May;59(5):999-1005.
  11. Heitzmann D, Derand R, Jungbauer S, Bandulik S, Sterner C, Schweda F, El WA, Lalli E, Guy N, Mengual R, et al. Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. *EMBO J.* 2008 Jan 9;27(1):179-87.
  12. Spat A, Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev.* 2004 Apr;84(2):489-539.
  13. Wilke BU, Lindner M, Greifenberg L, Albus A, Kronimus Y, Bunemann M, Leitner MG, Oliver D. Diacylglycerol mediates regulation of TASK potassium channels by Gq-coupled receptors. *Nat.Comm.* 2014;5:5540.
  14. Bandulik S, Tauber P, Lalli E, Barhanin J, Warth R. Two-pore domain potassium channels in the adrenal cortex. *Pflugers Arch.* 2015 May;467(5):1027-42.
  15. Coll AP, Challis BG, Yeo GS, Snell K, Piper SJ, Halsall D, Thresher RR, O'Rahilly S. The effects of proopiomelanocortin deficiency on murine adrenal development and responsiveness to adrenocorticotropin. *Endocrinology* 2004 Oct;145(10):4721-7.
  16. Aguilera G, Kiss A, Lu A, Camacho C. Regulation of adrenal steroidogenesis during chronic stress. *Endocr.Res.* 1996 Nov;22(4):433-43.
  17. Lin D, Sugawara T, Strauss JF, III, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 1995 Mar 24;267(5205):1828-31.
  18. Stocco DM. Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Mol.Endocrinol.* 2001 Aug;15(8):1245-54.
  19. Perkins LM, Payne AH. Quantification of P450<sub>scc</sub>, P450(17) alpha, and iron sulfur protein reductase in Leydig cells and adrenals of inbred strains of mice. *Endocrinology* 1988 Dec;123(6):2675-82.
-

20. Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2000 Nov;279(5):F793-F801.
  21. Lotshaw DP. Effects of K<sup>+</sup> channel blockers on K<sup>+</sup> channels, membrane potential, and aldosterone secretion in rat adrenal zona glomerulosa cells. *Endocrinology* 1997 Oct;138(10):4167-75.
  22. Enyedi P, Czirjak G. Molecular background of leak K<sup>+</sup> currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev.* 2010 Apr;90(2):559-605.
  23. Mathie A, Al-Moubarak E, Veale EL. Gating of two pore domain potassium channels. *J.Physiol* 2010 Sep 1;588(Pt 17):3149-56.
  24. Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C, Lazdunski M. TASK, a human background K<sup>+</sup> channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.* 1997 Sep 1;16(17):5464-71.
  25. Czirjak G, Fischer T, Spat A, Lesage F, Enyedi P. TASK (TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol.Endocrinol.* 2000 Jun;14(6):863-74.
  26. Lopes CM, Gallagher PG, Buck ME, Butler MH, Goldstein SA. Proton block and voltage gating are potassium-dependent in the cardiac leak channel Kcnk3. *J.Biol.Chem.* 2000 Jun 2;275(22):16969-78.
  27. Enyeart JJ, Enyeart JA. Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channels of normal human adrenal zona fasciculata cells: properties and modulation by ACTH and AngII. *J.Gen.Physiol* 2013 Aug;142(2):137-55.
  28. Enyeart JA, Danthi SJ, Enyeart JJ. TREK-1 K<sup>+</sup> channels couple angiotensin II receptors to membrane depolarization and aldosterone secretion in bovine adrenal glomerulosa cells. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 2004 Dec;287(6):E1154-E1165.
  29. Enyeart JJ, Liu H, Enyeart JA. Evidence for cAMP-independent bTREK-1 inhibition by ACTH and NPS-ACTH in adrenocortical cells. *Mol.Cell Endocrinol.* 2012 Jan 2;348(1):305-12.
-

30. Enyeart JJ, Xu L, Danthi S, Enyeart JA. *An. J.Biol.Chem.* 2002 Dec 20;277(51):49186-99.
  31. Liu H, Enyeart JA, Enyeart JJ. Angiotensin II inhibits native bTREK-1 K<sup>+</sup> channels through a PLC-, kinase C-, and PIP2-independent pathway requiring ATP hydrolysis. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2007 Aug;293(2):C682-C695.
  32. Jespersen T, Grunnet M, Olesen SP. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology.(Bethesda.)* 2005 Dec;20:408-16.
  33. Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 1996 Nov 7;384(6604):80-3.
  34. Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 1996 Nov 7;384(6604):78-80.
  35. Tinel N, Diochot S, Borsotto M, Lazdunski M, Barhanin J. KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J.* 2000 Dec 1;19(23):6326-30.
  36. Eldstrom J, Fedida D. The voltage-gated channel accessory protein KCNE2: multiple ion channel partners, multiple ways to long QT syndrome. *Expert.Rev.Mol.Med.* 2011;13:e38.
  37. Schroeder BC, Waldegger S, Fehr S, Bleich M, Warth R, Greger R, Jentsch TJ. A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* 2000 Jan 13;403(6766):196-9.
  38. Bendahhou S, Marionneau C, Haurogne K, Larroque MM, Derand R, Szuts V, Escande D, Demolombe S, Barhanin J. In vitro molecular interactions and distribution of KCNE family with KCNQ1 in the human heart. *Cardiovasc.Res.* 2005 Aug 15;67(3):529-38.
  39. Grunnet M, Jespersen T, Rasmussen HB, Ljungstrom T, Jorgensen NK, Olesen SP, Klaerke DA. KCNE4 is an inhibitory subunit to the KCNQ1 channel. *J.Physiol* 2002 Jul 1;542(Pt 1):119-30.
-

40. Piccini M, Vitelli F, Seri M, Galletta LJ, Moran O, Bulfone A, Banfi S, Pober B, Renieri A. KCNE1-like gene is deleted in AMME contiguous gene syndrome: identification and characterization of the human and mouse homologs. *Genomics* 1999 Sep 15;60(3):251-7.
  41. Vallon V, Grahammer F, Volkl H, Sandu CD, Richter K, Rexhepaj R, Gerlach U, Rong Q, Pfeifer K, Lang F. KCNQ1-dependent transport in renal and gastrointestinal epithelia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005 Dec 6;102(49):17864-9.
  42. Arrighi I, Bloch-Faure M, Grahammer F, Bleich M, Warth R, Mengual R, Drici MD, Barhanin J, Meneton P. Altered potassium balance and aldosterone secretion in a mouse model of human congenital long QT syndrome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001 Jul 17;98(15):8792-7.
  43. Yang WP, Levesque PC, Little WA, Conder ML, Shalaby FY, Blannar MA. KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997 Apr 15;94(8):4017-21.
  44. Xie J, McCobb DP. Control of alternative splicing of potassium channels by stress hormones. *Science* 1998 Apr 17;280(5362):443-6.
  45. Lai GJ, McCobb DP. Opposing actions of adrenal androgens and glucocorticoids on alternative splicing of Slo potassium channels in bovine chromaffin cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002 May 28;99(11):7722-7.
  46. Zhu N, Eghbali M, Helguera G, Song M, Stefani E, Toro L. Alternative splicing of Slo channel gene programmed by estrogen, progesterone and pregnancy. *FEBS Lett.* 2005 Aug 29;579(21):4856-60.
  47. Lu R, Alioua A, Kumar Y, Eghbali M, Stefani E, Toro L. MaxiK channel partners: physiological impact. *J.Physiol* 2006 Jan 1;570(Pt 1):65-72.
  48. Sausbier M, Arntz C, Bucurenciu I, Zhao H, Zhou XB, Sausbier U, Feil S, Kamm S, Essin K, Sailer CA, et al. Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation* 2005 Jul 5;112(1):60-8.
  49. Choi M, Scholl UI, Yue P, Bjorklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, Ji W, Cho Y, Patel A, Men CJ, et al. K<sup>+</sup> channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* 2011 Feb 11;331(6018):768-72.
-

50. Monticone S, Hattangady NG, Nishimoto K, Mantero F, Rubin B, Cicala MV, Pezzani R, Auchus RJ, Ghayee HK, Shibata H, et al. Effect of KCNJ5 mutations on gene expression in aldosterone-producing adenomas and adrenocortical cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2012 Aug;97(8):E1567-E1572.
  51. Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Heurteaux C, Fosset M, Romey G, Barhanin J, Lazdunski M. Molecular properties of neuronal G-protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *J.Biol.Chem.* 1995 Dec 1;270(48):28660-7.
  52. Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y. G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol.Rev.* 1998 Dec;50(4):723-60.
  53. Oki K, Plonczynski MW, Lam ML, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE. The potassium channel, Kir3.4 participates in angiotensin II-stimulated aldosterone production by a human adrenocortical cell line. *Endocrinology* 2012 Sep;153(9):4328-35.
  54. Dibb KM, Rose T, Makary SY, Claydon TW, Enkvetchakul D, Leach R, Nichols CG, Boyett MR. Molecular basis of ion selectivity, block, and rectification of the inward rectifier Kir3.1/Kir3.4 K<sup>(+)</sup> channel. *J.Biol.Chem.* 2003 Dec 5;278(49):49537-48.
  55. Zennaro MC, Jeunemaitre X. Mutations in KCNJ5 gene cause hyperaldosteronism. *Circ.Res.* 2011 Jun 10;108(12):1417-8.
  56. Scholl UI, Lifton RP. New insights into aldosterone-producing adenomas and hereditary aldosteronism: mutations in the K<sup>+</sup> channel KCNJ5. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 2013 Mar;22(2):141-7.
  57. Tauber P, Penton D, Stindl J, Humberg E, Tegtmeier I, Sterner C, Beuschlein F, Reincke M, Barhanin J, Bandulik S, et al. Pharmacology and pathophysiology of mutated KCNJ5 found in adrenal aldosterone-producing adenomas. *Endocrinology* 2014 Apr;155(4):1353-62.
  58. Davies E, MacKenzie SM. Extra-adrenal production of corticosteroids. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 2003 Jul;30(7):437-45.
  59. Douma S, Petidis K, Doumas M, Papaefthimiou P, Triantafyllou A, Kartali N, Papadopoulos N, Vogiatzis K, Zamboulis C. Prevalence of primary hyperaldosteronism in resistant hypertension: a retrospective observational study. *Lancet* 2008 Jun 7;371(9628):1921-6.
-

60. Mosso L, Carvajal C, Gonzalez A, Barraza A, Avila F, Montero J, Huete A, Gederlini A, Fardella CE. Primary aldosteronism and hypertensive disease. *Hypertension* 2003 Aug;42(2):161-5.
  61. Nogueira EF, Gerry D, Mantero F, Mariniello B, Rainey WE. The role of TASK1 in aldosterone production and its expression in normal adrenal and aldosterone-producing adenomas. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 2010 Jul;73(1):22-9.
  62. Rossi GP, Pessina AC, Heagerty AM. Primary aldosteronism: an update on screening, diagnosis and treatment. *J.Hypertens.* 2008 Apr;26(4):613-21.
  63. Zennaro MC, Boulkroun S, Fernandes-Rosa F. An update on novel mechanisms of primary aldosteronism. *J.Endocrinol.* 2015 Feb;224(2):R63-R77.
  64. Rossi GP. Cardiac consequences of aldosterone excess in human hypertension. *Am.J.Hypertens.* 2006 Jan;19(1):10-2.
  65. Rizzoni D, Porteri E, Castellano M, Bettoni G, Muiesan ML, Tiberio G, Giulini SM, Rossi G, Bernini G, Agabiti-Rosei E. Endothelial dysfunction in hypertension is independent from the etiology and from vascular structure. *Hypertension* 1998 Jan;31(1 Pt 2):335-41.
  66. Mantero F, Lucarelli G. Aldosterone antagonists in hypertension and heart failure. *Ann.Endocrinol.(Paris)* 2000 Feb;61(1):52-60.
  67. Campbell SE, Diaz-Arias AA, Weber KT. Fibrosis of the human heart and systemic organs in adrenal adenoma. *Blood Press* 1992 Oct;1(3):149-56.
  68. Rossi GP, Sacchetto A, Visentin P, Canali C, Graniero GR, Palatini P, Pessina AC. Changes in left ventricular anatomy and function in hypertension and primary aldosteronism. *Hypertension* 1996 May;27(5):1039-45.
  69. Morillas P, Castillo J, Quiles J, Nunez D, Guillen S, Bertomeu-Gonzalez V, Pomares F, Bertomeu V. [Prevalence of primary aldosteronism in hypertensive patients and its effect on the heart]. *Rev.Esp.Cardiol.* 2008 Apr;61(4):418-21.
-



70. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N.Engl.J.Med.* 1999 Sep 2;341(10):709-17.
  71. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N.Engl.J.Med.* 2003 Apr 3;348(14):1309-21.
  72. Karram T, Abbasi A, Keidar S, Golomb E, Hochberg I, Winaver J, Hoffman A, Abassi Z. Effects of spironolactone and eprosartan on cardiac remodeling and angiotensin-converting enzyme isoforms in rats with experimental heart failure. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2005 Oct;289(4):H1351-H1358.
  73. Davies LA, Hu C, Guagliardo NA, Sen N, Chen X, Talley EM, Carey RM, Bayliss DA, Barrett PQ. TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2008 Feb 12;105(6):2203-8.
  74. Wotus C, Levay-Young BK, Rogers LM, Gomez-Sanchez CE, Engeland WC. Development of adrenal zonation in fetal rats defined by expression of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase. *Endocrinology* 1998 Oct;139(10):4397-403.
  75. Aller MI, Veale EL, Linden AM, Sandu C, Schwaninger M, Evans LJ, Korpi ER, Mathie A, Wisden W, Brickley SG. Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons. *J.Neurosci.* 2005 Dec 7;25(49):11455-67.
  76. Romero DG, Yanes LL, de Rodriguez AF, Plonczynski MW, Welsh BL, Reckelhoff JF, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE. Disabled-2 is expressed in adrenal zona glomerulosa and is involved in aldosterone secretion. *Endocrinology* 2007 Jun;148(6):2644-52.
  77. Bielohuby M, Herbach N, Wanke R, Maser-Gluth C, Beuschlein F, Wolf E, Hoeflich A. 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* 2007 Jul;293(1):E139-E146.
  78. Mazhari R, Nuss HB, Aroundas AA, Winslow RL, Marban E. Ectopic expression of KCNE3 accelerates cardiac repolarization and abbreviates the QT interval. *J.Clin.Invest* 2002 Apr;109(8):1083-90.
-

79. Dedek K, Waldegger S. Colocalization of KCNQ1/KCNE channel subunits in the mouse gastrointestinal tract. *Pflugers Arch.* 2001 Sep;442(6):896-902.
80. Czirjak G, Enyedi P. Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J.Biol.Chem.* 2002 Feb 15;277(7):5426-32.
81. Bandulik S, Tauber P, Penton D, Schweda F, Tegtmeier I, Sterner C, Lalli E, Lesage F, Hartmann M, Barhanin J, et al. Severe hyperaldosteronism in neonatal Task3 potassium channel knockout mice is associated with activation of the intraadrenal renin-angiotensin system. *Endocrinology* 2013 Aug;154(8):2712-22.
82. Boulkroun S, Samson-Couterie B, Golib-Dzib JF, Amar L, Plouin PF, Sibony M, Lefebvre H, Louiset E, Jeunemaitre X, Meatchi T, et al. Aldosterone-producing adenoma formation in the adrenal cortex involves expression of stem/progenitor cell markers. *Endocrinology* 2011 Dec;152(12):4753-63.
83. Sarzani R, Pietrucci F, Francioni M, Salvi F, Letizia C, D'Erasmo E, Dessi FP, Rappelli A. Expression of potassium channel isoforms mRNA in normal human adrenals and aldosterone-secreting adenomas. *J.Endocrinol.Invest* 2006 Feb;29(2):147-53.
84. Brenner T, O'Shaughnessy KM. Both TASK-3 and TREK-1 two-pore loop K channels are expressed in H295R cells and modulate their membrane potential and aldosterone secretion. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 2008 Dec;295(6):E1480-E1486.
85. Keshavaprasad B, Liu C, Au JD, Kindler CH, Cotten JF, Yost CS. Species-specific differences in response to anesthetics and other modulators by the K2P channel TRESK. *Anesth.Analg.* 2005 Oct;101(4):1042-9, table.
86. Funder JW. Medicine. The genetics of primary aldosteronism. *Science* 2011 Feb 11;331(6018):685-6.
87. Scholl UI, Stolting G, Nelson-Williams C, Vichot AA, Choi M, Loring E, Prasad ML, Goh G, Carling T, Juhlin CC, et al. Recurrent gain of function mutation in calcium channel CACNA1H causes early-onset hypertension with primary aldosteronism. *Elife.* 2015;4:e06315.
88. Scholl UI, Healy JM, Thiel A, Fonseca AL, Brown TC, Kunstman JW, Horne MJ, Dietrich D, Riemer J, Kucukoylu S, et al. Novel somatic mutations in primary hyperaldosteronism are

related to the clinical, radiological and pathological phenotype. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 2015 Aug 7.

89. Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 2006 Dec 4;25(57):7469-81.
  90. Kikuchi A. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci.* 2003 Mar;94(3):225-9.
  91. El WA, Lalli E. The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer. *Mol.Cell Endocrinol.* 2011 Jan 30;332(1-2):32-7.
  92. Suwa T, Chen M, Hawks CL, Hornsby PJ. Zonal expression of dickkopf-3 and components of the Wnt signalling pathways in the human adrenal cortex. *J.Endocrinol.* 2003 Jul;178(1):149-58.
  93. Chen M, Hornsby PJ. Adenovirus-delivered DKK3/WNT4 and steroidogenesis in primary cultures of adrenocortical cells. *Horm.Metab Res.* 2006 Sep;38(9):549-55.
  94. El WA, Bandulik S, Guy N, Bendahhou S, Zennaro MC, Niehrs C, Mari B, Warth R, Barhanin J, Lalli E. Dkk3 is a component of the genetic circuitry regulating aldosterone biosynthesis in the adrenal cortex. *Hum.Mol.Genet.* 2012 Nov 15;21(22):4922-9.
  95. Tanaka S, Matsuzawa A. Comparison of adrenocortical zonation in C57BL/6J and DDD mice. *Exp.Anim* 1995 Oct;44(4):285-91.
  96. Tsujio M, Mizorogi T, Nishijima K, Kuwahara S, Aoyama H, Ohno T, Tanaka S. A morphometric study of the adrenal cortex of the female DDD mouse. *J.Vet.Med.Sci.* 2009 Feb;71(2):183-7.
-

## 8. Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1: Aufbau der menschlichen Nebenniere .....	6
Abbildung 2: Das Renin-Angiotensin-System. ....	7
Abbildung 3: Wirkmechanismus des Ang II auf die Aldosteronproduktion. ....	9
Abbildung 4: Die Syntheseschritte von Aldosteron und Cortisol aus Cholesterin beim Menschen. ....	12
Abbildung 5: Regulation von TREK1.....	16
Abbildung 6: Plasmaaldosteronkonzentration von wt und <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....	42
Abbildung 7: graphische Darstellung der Cyp11b2-Expression in Nebennieren von <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> und wt Mäusen.....	44
Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung der Aldosteronsynthese (grün) in Nebennieren von wt & <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....	46
Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung von Aldosteronsynthese (grün) in Nebennieren von weiblichen <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen. ....	46
Abbildung 10: Lokalisation von dab2 (rot) und Aldosteronsynthese (grün) in Nebennieren von wildtyp & <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....	47
Abbildung 11: graphische Darstellung der Cyp11b1-mRNA-Expression in Nebennieren von <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> und wt Mäusen.....	49
Abbildung 12: graphische Darstellung der relativen Kcnq1-mRNA-Expression in Nebennieren von wt & <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....	51
Abbildung 13: graphische Darstellung der relativen Kcne3-mRNA-Expression in Nebennieren von wt & <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen. ....	52
Abbildung 14: graphische Darstellung der relativen Kcne4-MRNA-Expression in Nebennieren von wt & <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....	53
Abbildung 15: graphische Darstellung der relativen Trek1-mRNA-Expression in Nebennieren von wt & <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen. ....	54
Abbildung 16: graphische Darstellung der relativen Kcnma1-mRNA-Expression in Nebennieren von wt & <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....	56
Abbildung 17: graphische Darstellung der relativen Task3-mRNA-Expression in Nebennieren von wt & <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....	57
Abbildung 18: graphische Darstellung der relativen Task2-mRNA-Expression in Nebennieren von wt & <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....	58
Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung mit Kcnq1 (rot) in einer Nebenniere einer <i>Kcnq1</i> <sup>-/-</sup> Maus.....	59
Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung mit Kcnq1 (rot) in Nebennieren von wt & <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....	59
Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung mit Task3 (rot) in Nebennieren von wt & <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen. ....	61
Abbildung 22: Westernblot von murinen wt & <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Nebennieren und einer <i>Kcnq1</i> <sup>-/-</sup> Nebenniere mit Markierung für Kcnq1. ....	62
Abbildung 23: Westernblot mit Markierung für Kcnma1.....	63
Abbildung 24: Westernblot von weiblichen <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> & wt Nebennieren und <i>Kcnq1</i> <sup>-/-</sup> Nebenniere mit Markierung von β-Aktin.....	64

Abbildung 25: graphische Darstellung der auf $\beta$ -Aktin normierten Kcnma1-Kanal-Expressionen. ....	64
Abbildung 26: Darstellung der gemittelten Plasmaaldosteronkonzentrationen der unterschiedlichen Mausgruppen in Abhängigkeit von den injizierten Substanzen und der Diät. ....	66

Tabelle 1: Cyp11b2-mRNA-Expression in Nebennieren und Plasmaaldosteronkonzentration von wt & <i>Task1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....	43
--	----

## 9. Abkürzungsverzeichnis

---

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

Abkürzung	Bezeichnung
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon/Vasopressin
AK	Antikörper
Ang I & II	Angiotensin I & II
ANP	Anti natriuretisches Peptid
AT <sub>1</sub> -R	Angiotensin-Rezeptor-1
BSA	Bovines Serumalbumin
CDC	Cinnamylidihydroxycyanocinnamat
C <sub>P</sub> -Wert	Crossing point Wert
CREB	cAMP response element-binding protein
C <sub>T</sub> -Wert	Cycle threshold
CYP	Cytochrom P450 Enzyme
CYP11B1	11 $\beta$ -Hydroxylase
CYP11B2	Aldosteronsynthase
d	Tag
Dab2	Disabled 2, mitogen-responsive phosphoprotein
DAG	Diacylglycerol
Dest.	destilliert
DHEA	Dehydroepiandrosteron
dkk	dickkopf
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dz	Dezonierte Aldosteronsynthase
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
HMR	Hydroxydimethyltrifluorobutoxychromanmethylethansulfonamid
h $\beta$ -aktin	Humans $\beta$ -aktin
IF	Immunfluoreszenz
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
K2P	2-P-Domänen Kaliumkanäle
KCNE	Potassium voltage-gated channel subfamily E
KCNJ	Potassium inwardly-rectifying channel subfamily J
KCNMA1	Potassium large conductance calcium-activated channel subfamily M $\alpha$
KCNQ1	Potassium voltage gated channel subfamily KQT member 1
KHK	Koronare Herzkrankheit
ko	knockout

LH	luteinisierendes Hormon
m	männlich
min	Minuten
M-MLV reverse Transkriptase	Moloney murine leukemia virus reverse Transkriptase
m $\beta$ -Aktin	Maus $\beta$ -Aktin
n	Anzahl der Versuchstiere
NN	Nebenniere
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
OD	Optische Dichte
p	probability
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PIP <sub>2</sub>	Phosphoinositoldiphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	phenylmethanesulfonylfluoride
POMC	Proopiomelanocortin
pp	postpartal
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIPA Puffer	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonucleic acid
ROMK	Renal outer medullary K <sup>+</sup> channel
rpm	Rounds per minute
RT-PCR	Realtime PCR
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SGK1	serum and glucocorticoid-regulated kinase 1
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
TALK	TWIK-related Alkaline-pH-activated K <sup>+</sup> channel
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus Polymerase (thermostabil)
TASK	Twik related acid sensitive K <sup>+</sup> channel
THIK	Tandem pore-domain Halothane Inhibited K <sup>+</sup> channel
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRAAK	TWIK related arachidonic acid stimulated K <sup>+</sup> channel
TREK	Twik related K <sup>+</sup> channel
TRESK	Twik related spinal chord K <sup>+</sup> channel
TWIK	Tandem of P domains in a Weak Inward rectifying K <sup>+</sup> channel
vs	versus
w	weiblich
wt	wildtyp

z	zonierte Aldosteronsynthese
ZF	Zona fasciculata
ZG	Zona glomerulosa



## 10. Anhang

---

### *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.

X

---

Anna-Sophia Kattner

## Danksagung

---

Zu großem Dank fühle ich mich all denen verpflichtet, die mir diese Arbeit ermöglichten.  
Vor allem Dr. Sascha Bandulik für seine qualitativ hervorragende, intensive und fortwährende Betreuung;

Prof. Dr. Warth für die Überlassung des Themas und seine freundliche, unterstützende und motivierende Hilfsbereitschaft;

Dr. Bandulik und Dr. Penton-Ribas für die Daten der Kastrations-Versuche;

Dr. Philipp Tauber für die Bereitstellung transfizierter HEK-Zellen zu Western-Blot Experimenten;

W. Wisden (IZN, Universität Heidelberg; *Task1<sup>-/-</sup>*) für die Bereitstellung der knockout Mausstämmen;

Christina Sterner und Ines Tegtmeyer für die Antworten rund ums Labor und der Realtime-PCR;

Dr. Philipp Tauber und PD Markus Reichold für die Erklärungen hinsichtlich Software betreffender Fragen.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen anderen Teilnehmern der Arbeitsgruppe, für ihr hilfsbereites Entgegenkommen.

Ganz herzlich danken möchte ich auch meiner Familie, insbesondere meinem Ehemann Daniel Kattner, meinen Eltern Anja und Dr. Georg Haubs und meiner Großmutter Helga Kruse-Klemusch, für ihre Geduld und konstruktive Unterstützung.