

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PHYSIOLOGIE
PROF. DR. ARMIN KURTZ
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Bedeutung des 2-P-Domänen-Kaliumkanals TASK3
für die Regulation der Atmung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Doris Utz

2011

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Richard Warth
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Banas
Tag der mündlichen Prüfung: 13. Februar 2012

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	5
1. Einleitung	7
1.1 Systematik der Kaliumkanäle	7
1.1.1 Klassifizierung.....	8
1.1.2 Funktionen	9
1.2 TASK3	14
1.2.1 2-P-Domänen-Kaliumkanäle	14
1.2.2 Molekulare Grundlagen von TASK3	16
1.2.3 Potentielle Funktionen.....	21
1.3 Konzepte zur Atmungsregulation	21
1.3.1 Zentralnervöser Schrittmacher	22
1.3.2 Atemreize	24
1.4 Der TASK3-Knockout.....	32
2. Zielsetzung.....	33
3. Material und Methoden.....	34
3.1 Material	34
3.1.1 Geräte	34
3.1.2 Verbrauchsmaterial	34
3.1.3 Chemikalien, Arzneistoffe.....	34
3.1.4 Enzyme, Kits	35
3.1.5 Oligonukleotide	35
3.1.6 Puffer, Lösungen.....	36
3.1.7 Software.....	36
3.2 Methoden.....	36
3.2.1 Mäuse	36
3.2.2 Molekularbiologische Methoden	37
3.2.2.1 Präparation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	37
3.2.2.2 PCR.....	38
3.2.2.3 Elektrophorese	39
3.2.2.4 Gewinnung von RNA aus Geweben der Maus.....	40
3.2.2.5 Herstellung von cDNA	40
3.2.2.6 Real-time-PCR	41
3.2.3 Plethysmographie.....	44
3.2.3.1 Anordnung und Messprinzip	44

3.2.3.1 Kalibrierung und Messung	46
3.2.4 Statistik	47
4. Ergebnisse	48
4.1 Expressionsmuster von TASK3	48
4.2 Phänotyp der TASK3 ^{-/-} -Maus: Respiration	48
4.2.1 Hyperkapnie	49
4.2.1.1 Männliche Mäuse unter Hyperkapnie	49
4.2.1.2 Weibliche Versuchstiere unter Hyperkapniebedingungen	52
4.2.2 Hypoxie	53
4.2.2.1 Initialphase der Hypoxie bei männlichen Mäusen	55
4.2.2.2 Die schnelle Hypoxieantwort der Weibchen	57
4.2.3 Stufenhypoxie	60
4.2.3.1 Stufenweise Sauerstoffreduktion – Männliche Versuchstiere	62
4.2.3.2 Stufenhypoxie – Weibchen	63
4.2.4 Langzeithypoxie	64
4.2.5 Isofluran	68
5. Diskussion	71
5.1 TASK3 in der Nebennierenrinde	71
5.2 TASK3 in Geweben neuroepithelialen Ursprungs	71
5.3 Einfluss von TASK3 auf die Atmungsregulation <i>in vivo</i>	72
5.3.1 Trotz TASK3 ^{-/-} erhaltener Atemstimulus unter Hyperkapnie	73
5.3.2 Kein kritischer Einfluss der TASK3-Defizienz bei akuter Hypoxie	73
5.3.3 Quantitativ kein Unterschied unter stufenweiser O ₂ -Absenkung	74
5.3.4 Langzeithypoxie: Ohne TASK3 stärkere hypoxische Depression	74
5.3.5 Leichtgradig verminderte Isofluran-induzierte Atemdepression	74
5.3.6 Klinische Bedeutung des TASK3-Mangels	75
6. Zusammenfassung	76
7. Literaturverzeichnis	78
8. Abbildungsverzeichnis	84
9. Abkürzungsverzeichnis	85
10. Anhang	88
10.1 Eigene Veröffentlichungen	88
10.2 Lebenslauf	89
10.3 Eidesstattliche Erklärung	91
11. Danksagung	92

1. Einleitung



„La fixité du milieu intérieur
est la condition d'une vie libre et indépendante“

Claude Bernard

Abb. 1: „Claude Bernard, the first systems biologist, and the future of physiology.“ (48)

„The general homeostasis biological concept developed by Claude Bernard in the 19th century is still today the guiding light (...) in [the] quest to improve human health[:] “Constance of the internal environment is the condition for a free and independent life.”“ (Quelle: Text und Bild akquiriert von <http://biolactis.com>).

1.1 Systematik der Kaliumkanäle

So unübertroffen die molekulare Vielfalt von K^+ -selektiven neben anderen Ionenkanälen ist, so mannigfaltig ist auch das Spektrum ihrer physiologischen, aber auch pathophysiologischen Funktionen (59). Einige Autoren sehen in Kaliumkanälen sogar den Ursprung anderer Ionenkanäle (25;30).

Seit der Entdeckung des ersten Kaliumkanal-Gens in der Mutante *Drosophila Shaker* identifizierte man eine stetig wachsende Zahl an Kaliumkanälen und je umfassender das Verständnis wurde, das man über sie gewann, desto größer wurde auch die Bandbreite an Krankheiten, die man mit Mutationen in den codierenden Genen zu erklären vermochte (61). Bisher konnte man 78 solchen Genen in Säugetieren entsprechende Funktionen als α -Kaliumkanaluntereinheiten zuordnen (50;61). Ihre Produkte, deren Eigenschaften in einigen Fällen mit zusätzlichen regulatorischen β -Untereinheiten (beispielsweise $Kv\beta$, $Kca\beta$, SUR oder IsK) modifiziert werden können, bilden dabei als Di- oder Tetramere mit

ihren hydrophoben Anteilen kaliumselektive Poren in Biomembranen (18;27;29;35;40;64). Die Funktion eines Selektivitätsfilters der beschriebenen Poren wird hierbei dem Tripeptid G(Y/F/L)G zugeschrieben, das jeweils in der Porenschleife jedes Kaliumkanals vorkommt. Einige Ausnahme bildet der allerdings fraglich funktionsfähige KCNK7, bei dem in einer seiner porenenformenden Tandemdomäne obiges Motiv durch GLE ersetzt ist (1;12;26;58;61).

1.1.1 Klassifizierung

Unter strukturellen Gesichtspunkten betrachtet, lassen sich diese 78 Proteine zunächst vereinfachend in drei große Gruppen einteilen (40): Am häufigsten finden sich Moleküle, deren hydrophober Kern von sechs bzw. sieben Transmembransegmenten (TMS) gebildet wird (50;51). Diese beinhalten, in gleicher Weise wie die zweite große Familie von Kaliumkanälen, deren Mitglieder zweimal die Membran durchspannen, jeweils eine porenbildende Domäne (P) (25). Im Gegensatz dazu finden sich bei der jüngst entdeckten Klasse mit vier TMS zwei porenbildende Schleifen (50). Diese dimerisieren schließlich zu funktionsfähigen Kanälen, während die Untereinheiten der ersten beiden Familien zu Tetrameren assoziieren (4).

Während spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_v), beispielsweise calciumaktivierte (K_{Ca}), zur ersten Familie gehören, bilden einwärtsgleichrichtende (Kir), wie G-Protein gekoppelte (GIRK) und ATP-sensitive Kanalproteine (K_{ATP}) die nächste Klasse (25). Die letzte Gruppe von kaliumselektiven Kanälen (KCNK oder K2P), die sich ihrerseits aus sechs Subfamilien zusammensetzt, zählt 15 Mitglieder, wobei jedoch noch nicht in allen Fällen ihre Funktion eindeutig geklärt ist (4;13;51):

- TWIK1 (KCNK1), TWIK2 (KCNK6) und KCNK7
- TASK1 resp. K_{2P}3.1 (KCNK3), TASK3 resp. K_{2P}9.1 (KCNK9) und TASK5 resp. K_{2P}15.1 (KCNK15)
- TREK1 (KCNK2), TREK2 (KCNK10) und TRAAK (KCNK4)
- TASK2 (KCNK5), TALK1 (KCNK16), TALK2/TASK4 (KCNK17)
- THIK1 (KCNK13), THIK2 (KCNK12)
- TRESK (KCNK18)

Folgende Grafik soll in Form eines phylogenetischen Baumes diese Zuordnungen durch das Aufzeigen der zugrunde liegenden Verwandschaftsverhältnisse nachvollziehbar machen:

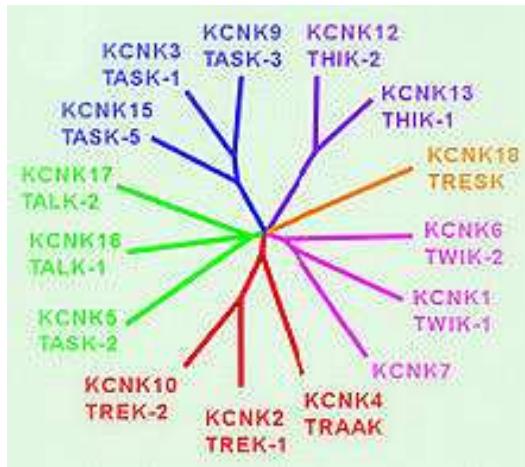


Abb. 2: Die K2P Familie

Die 15 Untereinheiten lassen sich nach strukturellen und funktionellen Gesichtspunkten in sechs Subfamilien einteilen, die hier jeweils durch unterschiedliche Farben markiert werden (Quelle: (51)).

Hierbei bezeichnet das durch die „Human Genome Organization“ - für Kaliumkanäle allgemein - etablierte Kürzel „KCN“ in Verbindung mit einem Buchstaben, in diesem Fall „K“, und einer Zahl, die der Reihenfolge der Entdeckung entspricht, jeweils das betreffende Gen, das dem durch die IUP („International Union of Pharmacology“) oft empirisch benannten Kanal zugrunde liegt (4;61). So wird in der Literatur zum einen systematisch die Abkürzung K2P oder K_2P vorgefunden, zum anderen sollen auf verwandte Charakteristiken hinweisende Akronyme die Unterscheidung erleichtern (4). Während darüber hinaus einzelne Autoren die Untersuchung nicht-humaner Spezies durch Kleinbuchstaben kenntlich zu machen versuchen (zum Beispiel (m)Task3 bzw. Kcnk9), um die Angabe in Majuskeln dem menschlichen Genom vorzubehalten, wird von der überwiegenden Mehrheit Groß- bzw. Kleinschreibung ganz gleich in welchem Kontext willkürlich angewandt. Um dem jeweiligen Akronym Rechnung zu tragen und im Dienste eines erleichterten Leseflusses werden im Rahmen dieser Arbeit Großbuchstaben verwendet und, falls nicht anders aus dem Zusammenhang ableitbar, entsprechende Präfixe gesetzt (beispielsweise „h“ für „human“).

1.1.2 Funktionen

Diese Vielfalt an stammesgeschichtlich großteils hochkonservierten Sequenzen einerseits, die Mannigfaltigkeit an zell- und gewebespezifischer Expression andererseits

machen also Kaliumkanäle zu entscheidenden Strukturen für grundlegende Prozesse eines Organismus (59). An dieser Stelle soll nun der Versuch unternommen werden, einen Überblick über diese Vorgänge zu geben, wobei eben gerade ihre auszeichnende Diversität anhand von Beispielen lediglich einen Abriss möglich macht und somit kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben werden kann.

Elektrochemisches Potenzial. Vereinfacht betrachtet sind Kaliumkanäle zunächst wasserhaltige Poren in Biomembranen, die den selektiven passiven Durchtritt von K^+ gewährleisten (25). Zusammen mit ihrem ubiquitären Vorkommen in unerregbaren wie erregbaren Zellen prädestiniert aber gerade diese Eigenschaft solche Proteine für die Aufrechterhaltung eines für viele Regulationsvorgänge unabdingbaren negativen Ruhemembranpotenzials (61). Hinzu kommen ihre vergleichsweise hohen Offenwahrscheinlichkeiten, die eine gute Membrandurchlässigkeit für Kaliumionen zur Folge haben: Zunächst werden durch das ubiquitäre Enzym Na^+-K^+ -ATPase primär aktiv unter Energieverbrauch durch Biomembranen getrennte Kompartimente unterschiedlicher Ionenkonzentrationen erzeugt. Das hat zur Folge, dass chemische Gefälle entstehen, entlang derer die jeweiligen Ionen entsprechend der Membranleitfähigkeiten durch diese hindurchdrängen, mit dem Ziel, ihre Konzentrationen auszugleichen. Während dieses Vorgangs kommt es aufgrund der unterschiedlichen Permeabilitäten für die verschiedenen Ionen zu Ladungsverschiebungen über der jeweiligen Membran, die entsprechend der physikalischen Anziehungskräfte den Durchtritt der Ionen zunehmend erschweren. Schließlich ergibt sich ein Gleichgewichtszustand, wenn sich diese entgegengesetzten Kräfte kompensieren. Dies geschieht im Falle des Kaliums als nahezu einziger relevanten in Ruhe fließenden Strom bei einem negativen Zellinneren, wenn sich der nach außen gerichtete Konzentrationsgradient und das in das Zellinnere weisende Ladungsgefälle gegenseitig aufheben. Dieses dann als Kaliumgleichgewichtspotenzial bezeichnete Membranpotenzial kann nach Nernst zu etwa -90 mV berechnet werden. Dass unter Ruhebedingungen aber meist weniger stark negative Potentiale abgeleitet werden, liegt an der, wenn auch erheblich schlechteren Diffusion anderer Ionen, wie Natrium und Chlorid. So ergibt sich unter Anwendung der Goldmann-Gleichung für die meisten Arten von Zellen ein Ruhemembranpotenzial von ca. -70 mV. Dass aber hauptsächlich Kaliumkanäle für die Generierung dieses negativen Potenzials verantwortlich sind, wird auch dadurch deutlich, dass sie in besonderem Maße an hochaktiv transportierenden Epithelien, wie sie zum Beispiel in der Niere vorkommen, nachgewiesen werden können (25). Da hier sowohl luminal, als auch basolateral viele Transportprozesse elektrogen ablaufen, sorgen eine Vielfalt von Kaliumkanälen,

beispielsweise K_{ATP} und K_v , für die Aufrechterhaltung eines hyperpolarisierten Membranpotenzials (25).

Salz- und Wasserhaushalt. So wie dieses Potenzial für jede lebende Zelle sowohl notwendig für ihre Existenz, als auch unmittelbarer Ausdruck ihrer Aktivität ist, so bildet auch die zelluläre Ionen- und Wasserhomöostase zum einen eine fundamentale Voraussetzung für Leben überhaupt, zum anderen ist sie ein Charakteristikum ihres funktionierenden Metabolismus. Wiederum in der Niere fand man im proximalen Tubulus sowohl harn- als auch blutseitig Kaliumkanäle, die als Reaktion auf mechanischen Dehnungsreiz infolge natriuminduzierter Zellschwellung aktiviert werden und durch Kaliumverlust das Zellvolumen gegenregulieren (5;25).

Auch in der apikalen wie basolateralen Membran des menschlichen Kolonepithels konnte man unter anderem K_{Ca} und K_{ATP} nachweisen, wodurch neben einem parazellulärem ein transzellulärer Kaliumstrom über dieses Transportepithel fließen kann (44). In Kombination mit anderen primär und sekundär aktiven Ionentransportern wird so, ähnlich wie in der Niere, auf der einen Seite die Kaliumabsorption und –sekretion selbst, auf der anderen beispielsweise der $NaCl$ - und damit eng verbunden der Wasserhaushalt reguliert: Luminal über eine $H^+ \cdot K^+$ -ATPase aufgenommenes oder basolateral über einen $Na^+ \cdot K^+$ - $2Cl^-$ -Cotransporter und die $Na^+ \cdot K^+$ -ATPase in den Enterozyten gelangendes Kalium kann nach intrazellulärer Akkumulation über sowohl apikale, als auch basolaterale Kaliumkanäle, je nach elektrochemischem Gradient über der jeweiligen Membran, ausgeschieden werden (60). Im Dienste der Salz- und Wasserhomöostase können basolateral entlang eines elektrochemischen Na^+ und K^+ -Gradienten über obigen Cotransporter aufgenommene Chloridionen apikal über Cl^- -Kanäle das Kolon verlassen, während Natrium und H_2O parazellulär nachfolgen (44). Durch Kaliumrückdiffusion wird hier das Membranpotential und somit auch die Triebkraft für eine Chloridsekretion aufrechterhalten (44). Dieser Ablauf des Kaliumrecycling findet in nahezu identischer Art und Weise auch am dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife und an der Macula densa der Niere statt, was dafür spricht, dass es sich um phylogenetisch bewährte Mechanismen handelt, deren Aufgabe, wie im Falle des tubuloglomerulären Feedbacks in einem weitaus größerem Zusammenhang als nur den Stoffwechsel einer einzelnen Zelle betreffend zu sehen ist (25). So werden selbst die mit diesem Kaliumrecycling einhergehenden Ladungsverschiebungen über die betreffenden Membranen, beispielsweise in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife als lumenpositives transepitheliales Potenzial, für parazellulären Ionentransport genutzt (25).

Kommunikation. So wie die Regulation des Ionen- und Wasser-Stoffwechsels am Übergang von der Einzelzelle zum Zellverband einerseits an Komplexität zunimmt, ihr andererseits aber auch neue Mechanismen eröffnet werden, so gewinnt auch das innerhalb eines mehrzelligen Organismus aufrechterhaltene Ruhemembranpotenzial durch die Option der intra- und interzellulären Kommunikation bedeutend an Sinnhaftigkeit. Wie schon für die Ionen- und Wasserhomöostase dargelegt, spielen Kaliumkanäle also nicht nur auf der Ebene der isolierten Zelle, sondern insbesondere für das Zusammenspiel mehrerer Zellverbände, die zu einem Organismus gehören, eine bedeutende Rolle.

Ihre Einflussnahme auf das Zustandekommen und die Dauer von Aktionspotenzialen befindet sich an kritischer Stelle von zellulären Signalwegen und modifiziert somit entscheidend kommunikative und für den jeweiligen Organismus folgenreiche Prozesse (25;59;61).

Ein solcher, mittlerweile schon sehr lange verstandener fundamentaler Vorgang ist die glucoseinduzierte Sekretion von Insulin aus den pankreatischen β -Zellen, ermöglicht durch die unmittelbare Kopplung von metabolischen und elektrischen Phänomenen: Während Energiemangel infolge einer Zunahme der Öffnungswahrscheinlichkeit des einwärtsgleichrichtenden K_{ATP} zu einer Hyperpolarisation führt, bewirkt ein Überangebot an Energieäquivalenten über eine Depolarisation elektrische Aktivität (20). Diese kann dann beispielsweise Kontraktionen, wie sie für mesangiale glatte Muskelzellen der Niere oder arterioläre glatte Muskelzellen beschrieben sind, zur Konsquenz haben. Ebenso kann die Sekretion von Neurotransmittern, bzw. wie im vorliegenden Beispiel über eine Erhöhung des intrazellulären Calciums, von Hormonen, hier Insulin, folgen (20;25). Dieser ATP-sensitive Kaliumkanal Kir6.2 als Repräsentant der zweiten großen Hauptgruppe ist neben dieser metabolisch-elektrischen Kopplung weiterhin ein Exempel eines $4\alpha 4\beta$ -Heteromers, dessen akzessorische β -Untereinheiten SUR1 mit den porenbildenden α -Schleifen einen Komplex bilden (20;61).

Zellregulation. Ein Indiz dafür, dass die Vielfalt der Kaliumkanäle evolutisch betrachtet bei weitem mehr als nur Nebenprodukt phylo- und ontogenetischer Entwicklungen ist, sondern diese sogar vorantreibt, ist ihre nachgewiesene Rolle im Rahmen des Zellzyklus, quasi als direkt verursachendes Moment des Übergangs vom Ein- zum Mehrzeller (71). So spielt beispielsweise Kv1.3 eine kritische Rolle in der G1 Progression von T-Lymphozyten und die Bedeutung des durch den EAG-Kanal als einen wichtigen Vertreter der Familie spannungsgesteuerter Kaliumkanäle induzierten Stroms im Ablauf der Tumorigenese wurde bereits für mehrere Zellreihen belegt (67;71). Eine Diskrepanz im Expressionsmuster des letzteren, der sich zwar in transformierten Brustkrebszellen, nicht

jedoch in deren gesunden nicht entarteten Korrelat detektieren lässt, weist auf sein onkogenes Potenzial hin, das zum Beispiel auch einen wichtigen Faktor bei der Entstehung des Gebärmutterhalskrebses darstellt (67).

Zum Zwecke der Wahrung der Zellhomöostase ist dem Vorgang physiologisch regulierter Proliferation, aus dem, wie zuvor beschrieben, unkontrolliertes Tumorwachstum entstehen kann, der Mechanismus der Apoptose gegenübergestellt (39). Genauso, wie die Apoptose nicht minder von fundamentaler Relevanz ist als das Zellwachstum, genauso gleichbedeutend ist dabei die Rolle von Kaliumkanälen, sowohl inter-, als auch intrazellulär (9). Dabei kann blockierter Zelltod über den Mechanismus der Zellhyperplasie beispielsweise in Hypertension resultieren und damit ebenso schwerwiegende Konsequenzen zur Folge haben, wie übermäßig stattfindende Apoptose, wie dies bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen der Fall ist (9;61).

Zellwanderung. Nicht nur auf der Suche nach einem Verständnis für die Entstehung von Tumorabsiedelungen, sondern bei einer Vielzahl von Erklärungsansätzen für Vorgänge, die eine Mobilität von Zellen bedingen, stößt man auf K⁺-Kanäle als wichtige Schaltstelle in der Kaskade der Fortbewegung (66). Der grundlegende Charakter von lebenswichtigen Prozessen, die nur mithilfe der Zellmigration ablaufen können, angefangen von der Embryogenese, die Leben überhaupt erst möglich macht, untersteht ein weiteres Mal die hochkonservierte und ursächliche Bedeutung von kaliumselektiven Ionenkanalproteinen (69). Aber auch Immunabwehr und Wundheilung sind Mechanismen, die für jedes Lebewesen unbedingt notwendig sind, um eine gewisse Integrität der Außenwelt gegenüber zu wahren (66). So detektierte man beispielsweise Kv2.1 in Epithelzellen der Kornea und konnte ihm eine Rolle bei ihrer Wundheilung zuweisen (69). Außerdem fand man heraus, dass K_{ATP} und KvLTQ1 einen entscheidenden Beitrag zur Restitution des Alveolarepithels der Lunge leisten, wie dies zum Beispiel im Rahmen der Regeneration nach einem ARDS lebensnotwendig ist (65).

Varia. Der herausragenden Bedeutung dieser Proteine nicht genug, reicht ihr Spektrum an Aufgaben wohl weit über das einer reinen Kaliumkanal-Funktion hinaus: beispielsweise durch direkte Interaktion mit Syntaxin1A, das mit weiteren SNARE Proteinen einen Fusionskomplex mit dem Ziel regulierter Exozytose bildet, fördert Kv2.1 in neuroendokrinen Zellen die Ausschleusung von DCVs, und zwar völlig unabhängig von Veränderungen des zellulären Milieus, die auf seine Funktion als kaliumselektive Pore zurückzuführen sind (62).

1.2 TASK3

Zuletzt schließlich über die Funktion eines reinen Ionenkanals hinausgehend wird nun von dieser Übersicht über die allgemeinen Aufgaben zum Fokus dieser Arbeit übergegangen. Zu diesem Zweck werden zunächst bereits andernorts gemachte Beobachtungen zusammengestellt, um darauf aufbauend, mein konkretes Ziel zu begründen.

So soll also im Folgenden ein Protein namens TASK3 – **TWIK-related Acid-Sensitive K⁺ channel 3** - in den Mittelpunkt des Interesses gerückt werden. Dabei handelt es sich um eine Kaliumkanaluntereinheit, die man gemäß der eingangs eingeführten Systematik in der dritten großen Familie der Kaliumkanäle wiederfindet, die, anders als bisher gewohnt nicht nur eine, sondern zwei kaliumselektive Poren bilden (K2P).

Zunächst ist festzustellen, dass offensichtlich ein säureempfindliches Molekül vorliegt und eine wohl charakteristische Verwandtschaft zu einer anderen Struktur, genannt TWIK, besteht.

1.2.1 2-P-Domänen-Kaliumkanäle

Dabei bildet TWIK1 oder **Tandem of P domains in Weak Inward rectifier K⁺ channel** den Prototyp der K2P-Familie, den es als ersten menschlichen 4TMS/2P enthaltenden Kanal zu klonieren gelang (40). In der Folge entdeckte man 14 eben so genannte TWIK-ähnliche Proteine, die wie eingangs gelistet, in sechs Subfamilien eingeteilt werden können: Bei einer Länge von etwa 300-500 Aminosäuren verbindet diese zunächst eine gemeinsame strukturelle Organisation (40):

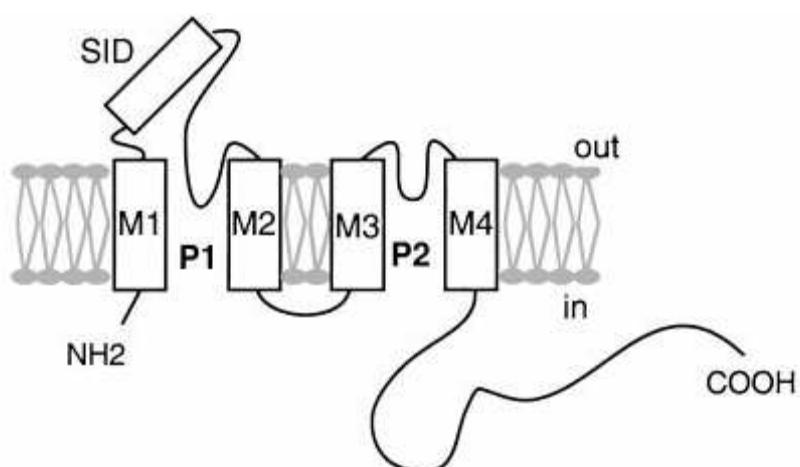


Abb. 3: Schema der Membranstruktur einer K2P Untereinheit

M1-M4 bezeichnen hier die charakteristischen vier Transmembrandomänen, P1 und P2 die beiden Porenschleifen (Quelle: (40)).

Hauptkennzeichen, die die Einheit dieser Kaliumkanalfamilie begründet, sind die vier membrandurchspannenden Segmente und die beiden Porendomänen, deren Sequenzen einen hohen Anteil an Homologien zu den porenbildenden Anteilen der zwei anderen großen Familien aufweisen (40). Weiterhin existiert ein kurzes amino- und ein langes carboxyterminales Ende, jeweils zytoplasmatisch gelegen, und eine verlängerte extrazelluläre Schleife zwischen M1 und P1 (13;40). Diese als amphipathisch beschriebende α -Helix wird, wie in obiger Grafik, auch als self-interacting domain (SID) bezeichnet, da sie für die geforderte Dimerisierung der für einen kaliumselektiven Filter essenziellen vier Porendomänen verantwortlich gemacht wird, indem, anders als bei den nichtkovalenten tetrameren Strukturen anderer Kaliumkanäle und nicht bei TASK1, bei adäquater Annäherung mithilfe von Cysteinresten Disulfidbrücken gebildet werden (13;40). Darüber hinaus wird ihr ein Einfluss auf die Regulation der Kanalaktivität zugeschrieben (13).

K2P-Kanäle bilden nun das molekulare Korrelat von nahezu spannungs- und zeitunabhängigen Kaliumströmen mäßiger Amplitude, die quasi im Hintergrund instantan und, außer TWIK2, immer aktiv sind und über den gleichsam durch Membranlecks erfolgenden ständigen Verlust positiver Valenzen in Form von K^+ das Ruhemembranpotenzial einer Zelle sicherstellen (4;6;50). Diese ‚background-‘ oder ‚leak- K^+ -Kanäle‘ zeigen unter symmetrischen Kaliumbedingungen eine charakteristische fast lineare Strom-Spannungskurve (50).

Weiterhin herausragend ist die Vielfalt der Regulationsmechanismen von K2P: Unempfindlich gegenüber den klassischen Kaliumkanalblockern, wie Tetraethylammonium (TEA) oder 4-Aminopyridin (4-AP), kann man durch diese Diversität mehrere Subgruppen voneinander abgrenzen (4;40): Während die Aktivität von TWIK1 und 2 beispielsweise über die Proteinkinase C (PKC) gesteigert und bei intrazellulärer Ansäuerung vermindert wird, reagieren TREK1, 2 und TRAAK insbesondere auf mechanischen Druck, Hitze, pH-Verschiebungen, mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Lysophospholipide (51). Innerhalb einer nächsten Gruppe von K2P ist das Hauptmerkmal von TALK1 und 2 resp. TASK4 die Empfindlichkeit für den herrschenden Umgebungs-pH, von TASK2 zusätzlich für hypotone Zellschwellung (51). THIK1 wird durch Arachidonsäure stimuliert und durch Halothan blockiert, während TRESK durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren inhibiert wird und sich seine Aktivität bei extremen Schwankungen der intra- wie extrazellulären Oxoniumionenkonzentration vermindert (51). Zur noch fehlenden Gruppe werden TASK5, 1 und schließlich 3 zusammengefasst, wobei TASK5, ebenso wie KCNK7 und THIK2 nach derzeitigem Kenntnisstand als nicht funktional gelten müssen (4;51). Die wesentliche Eigenschaft von TASK1 und 3 ist ihre

Empfindlichkeit gegenüber extrazellulären pH-Verschiebungen im physiologischen Bereich, wobei eine Ansäuerung die jeweiligen Ströme vermindert (40;51).

1.2.2 Molekulare Grundlagen von TASK3

Proteinstruktur. Zur Untersuchung der Primärstruktur als erstes determinierendes Moment spezifischer Proteinfunktion wurden zunächst tierische cDNA-Banken herangezogen (34;54). Dabei fiel auf, dass sich TASK1 und 3 in ihrer Aminosäuresequenz zu mehr als 70 % von anderen K2P unterscheiden, untereinander aber zu etwa 60 % identisch sind (34). Im Meerschweinchen, dessen TASK3-Primärstruktur zu nahezu 90 % mit der humanen übereinstimmt, wies man das für die Porendomäne von Kaliumkanälen allgemein typische TXG(Y/F/L)G Motiv in zwei unabhängigen Schleifen nach (54;61). Der relativ lange C-Terminus, der circa ein Drittel der Aminosäuresequenz einnimmt, beherbergt möglicherweise jeweils zwei Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C und Caseinkinase, eine für die cAMP-abhängige Proteinkinase und ein TASK1 homologes PDZ-Bindemotiv (54). Dass sich die endständige Sequenz dieses COOH-Endes bei keinen anderen K2P wieder findet, und dass ein sonst bei diesen Proteinen in der M1P1-Schleife anzutreffende Cysteinrest bei TASK1 und 3 durch eine N-Glykosylierungsstelle ersetzt ist, spricht für einen frühen und gemeinsamen stammesgeschichtlichen Ursprung von KCNK3 und 9 (54). Im TASK3-Gen der Ratte, das dem menschlichen zu etwa 70 % entspricht, kann man im C-Terminus und zusätzlich zwischen M2 und M3 jeweils eine weitere Phosphorylierungsstelle für PKA nachweisen, außerdem C-endständig einen dritten möglichen Angriffspunkt für die Proteinkinase C (34).

In der Folge konnte man die Basenfolge des KCNK9-Gens im humanem Genom auf Chromosom 8q24.3 nachweisen (12;34;54). Der davon abgeleitete offene Leserahmen (ORF) dieses menschlichen Gens, 1125 bp umfassend, der sich aus drei Exons zusammensetzt und schließlich für 374 Aminosäuren codiert, wird von zwei Introns unterbrochen (12). Das erste befindet sich dabei mit 83,6 kb in der Sequenz für P1 am ersten Glycin des GYG-Motivs, das zweite unterbricht die 3'-untranslated region (3'-UTR) und hat eine Länge von 5,6 kb (54). Letztendlich codierend für die cDNA des hTASK3 Kanalproteins sind dabei nur Informationen der ersten beiden Exons (12): In Übereinstimmung mit den orthologen TASK3-Proteinen anderer Säugetiere trägt die lange M1P1-Schleife eine mögliche N-Glykosylierungsstelle anstelle eines Cysteinrestes und es lassen sich mehrere potenzielle regulatorische Phosphorylierungsstellen nachweisen: An der intrazellulären M2M3-Schleife für die Caseinkinase II und 3'-ständig zweimal für die Caseinkinase II, drei für die PKC und eine Modifizierungsmöglichkeit für die PKA (12).

Lokalisation. Bei der Frage nach der geweblichen Verteilung von TASK3 berücksichtigte man auch den Verlauf während einer Ontogenese. So machte man sich die Technik der *in situ*-Hybridisierung zu Nutze um das Auftreten von TASK3 in Mäusen schon während der Embryogenese und der anschließenden postnatalen Entwicklung zu verfolgen (1). Dabei fiel auf, dass sich die Expression von mTASK3 in besonderer Weise auf das embryonale Gehirn und Rückenmark beschränkte und nur in einigen wenigen nichtneuronalen Strukturen, wie der Nebennierenrinde, ein dezentes Signal detektierbar war (1). Innerhalb des Gehirns wird TASK3 in der Embryonalzeit vor allem im Hirnstamm, dem Kleinhirn und dem Diencephalon exprimiert, während ein signifikanter Nachweis in telencephalen Strukturen erst postnatal gelingt (1).

Eine andere Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit Ratten und fand heraus, dass r(at)TASK3 im adulten Organismus vor allem im Gehirn, aber auch in Hodengewebe, der Nebenniere, in neuroepithelialen Zellen des Glomus caroticum und der Lunge und in geringer Menge auch im Herz und im Magen exprimiert wird (4;31). Innerhalb des Gehirns einer adulten Ratte sind es besonders cholinerge Zellpopulationen, die TASK3 exprimieren (31): Die motorischen Hirnnervenkerne, das Vorderhorn des Rückenmarks, der Septumkern, striatale Interneurone, Tegmentumkerne, und Kerne des diagonalen Bandes. Außerdem detektierte man große Mengen von KCNK9 im Mittelhirn und im Hirnstamm, vor allem im Locus coeruleus und in den Raphekernen als gut abgrenzbare Kerngebiete der Formatio reticularis, wo sich jeweils die Mehrheit an noradrenergen resp. serotoneren Neuronen befindet, aber auch in retikulären Kernarealen wird TASK3 exprimiert (31;68). Darüber hinaus kann TASK3 in diversen anderen Kernarealen und disseminierten Zellpopulationen, die keinem bestimmten Neurotransmittersystem zugeordnet werden können, wie Körnerzellen im Kleinhirn und im Riechkolben, und insbesondere der Amygdala, dem Hypothalamus und dem Thalamus, nachgewiesen werden (4;31).

Bisherige Informationen zur Expression von TASK3, die an menschlichen Geweben gewonnen wurden, lassen sich mit den obigen Ausführungen vereinbaren, wobei eine separate Untersuchung der Hypophyse auch hier ein positives Signal ergab (12).

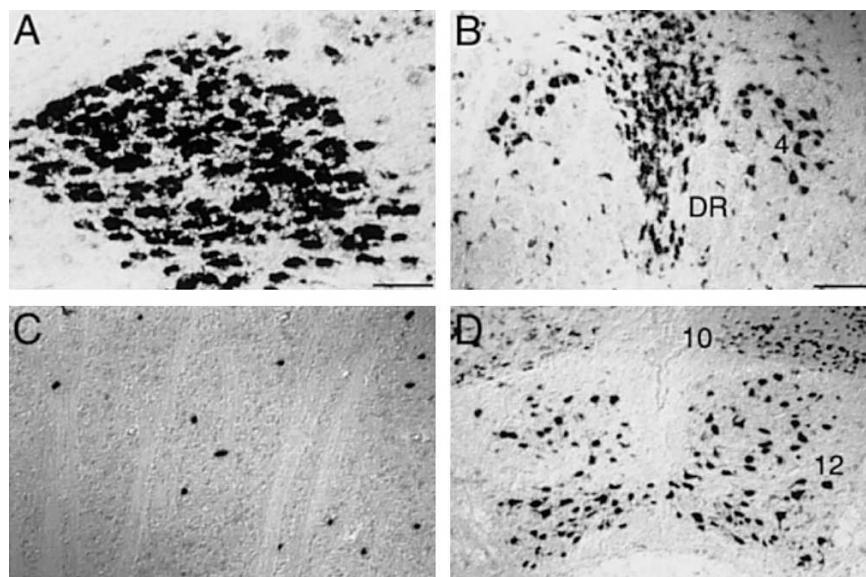


Abb. 4: TASK3 im Hirnstamm einer Ratte

Konzentriert findet sich dieser Kaliumkanal im noradrenergen Locus coeruleus (A), in den serotonergen dorsalen Raphekernen (B) und in cholinergen Kernen: Vereinzelt in den Stammganglien (C) und in motorischen Hirnnervenkernen (B, D: 4: Trochleariskerngebiet, 10: Motorischer Vaguskern, 12: Hypoglossuskern). Die Detektion erfolgte hier mithilfe von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden (Quelle: (31)).

Expression. Bevor es jedoch zu einer derart gewebespezifischen Proteinausstattung kommt, müssen die entsprechenden Gene transkribiert werden - ein erster potenzieller Angriffspunkt von Regulationsmechanismen, um die Expression eines Moleküls zu kontrollieren.

Das häufig bei vorwiegend in Neuronen exprimierten Genen anzutreffende Phänomen multipler Initiationsstellen für die Transkription, ebenso das Fehlen klassischer Promotorelemente, wie beispielsweise der TATA-Box, lässt sich auch für rTASK3 nachweisen (72). Diese Stellen befinden sich dabei in der 5'-UTR weiter stromaufwärts des codierenden Abschnitts im Anschluss an Regulationselemente, die posttranskriptional in die Translation eingreifen (72). Als Core- oder Minimal-Promotor konnte dabei eine GA-reiche Region mit Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1 und MAZ identifiziert werden, die sich in dieser wohl hochkonservierten Form auch beim Menschen nachweisen lässt (72). Weitere Determinanten der TASK3-Genexpression sind in einem inhibierenden Einfluss der 3'-UTR und in einem durch Depolarisation induzierten Calciumeinstrom zu suchen (72).

Ein nächster komplex regulierter Vorgang auf dem Weg zu einem funktionsfähigen Protein ist sein Transport an den Ort der Bestimmung. Für eine Oberflächenexpression von TASK3 werden ein C-terminales KSV-Motiv und daran bindende Proteine postuliert (4). Zu diesen gehört unter anderem die 14-3-3 Familie, deren Bezeichnung auf ihr charakteristisches Verhalten in Chromatographie und Elektrophorese zurückgeht, und, hochkonserviert, da in jeder eukaryotischen Zelle vorkommend, mit über 100 Liganden

unterschiedlichste Signalwege beeinflusst. Ein phosphoryliertes Serin ($KS^P V$) ist nun Voraussetzung für ihre Bindung mit konsekutiver Verdängung des Kanalproteins vom β -coat protein (β -COP), das andernfalls über ein basisches Dipeptid (KR) im Aminoterminus im ER zurückgehalten wird (4). Im Falle eines defekten ER-Retentionsmotivs oder einer einfachen Überexpression jedoch wird eine 14-3-3 Interaktion entbehrlich für TASK3, um an die Zelloberfläche zu gelangen (4;73).

Elektrophysiologie und Regulation. Zum Zwecke von Voltage-Clamp-Studien injizierte man hTASK3 cDNA unter anderem direkt in den Zellkern von unreifen Eizellen einer bestimmten Spezies von Krallenfröschen, *Xenopus laevis* (12;44;52). Für weitergehende Fragestellungen transfizierte man HEK293 Zellen, um in Patch-Clamp-Technik auch Einzelkanäle zu untersuchen (12;45;54).

Dabei fand man im Konsens mit den bisherigen Ergebnissen zu anderen K2P ein deutlich hyperpolarisiertes Nullstrom- oder Ruhepotenzial als Korrelat einer instantanen Hintergrundleitfähigkeit im Bereich physiologischer Spannungsschwankungen beim Vergleich mit den Wildtypzellen (4;12;13;45).

Während die stufenweise Depolarisierung von ganzen Zellen große, schnell aktivierende Ströme messbar macht, die nur bei starker Positivierung eine leichte Abschwächung erfahren, erzeugt Hyperpolarisierung allenfalls verschwindend geringe Ströme, jeweils ohne inaktivierende Komponente (12;45). So entsteht insgesamt das Bild einer nicht linearen Strom-Spannungskurve (2;54). Die dabei an HEK293-Zellen in Einzelkanalableitung detektierbare einwärtsgleichrichtende Kinetik geht bei positiveren Potenzialen in durch Voltage-Clamp-Technik ableitbare auswärtsgerichtete Kationenströme über (4;54). Dass es sich dabei um kaliumselektive Ströme handelt belegen Messungen unter zunehmenden extrazellulären Kaliumkonzentrationen, die deren Umkehrpotenzial, bei dem definitionsgemäß netto kein Ionenfluss über die Membran stattfindet, auf positive Werte hin verschieben (12), bis es schließlich unter symmetrischen Kaliumbedingungen bei 0 mV zu liegen kommt (54). Die Beziehung extrazellulärer Kaliumkonzentration und dem daraus resultierendem Gleichgewichtspotenzial lässt sich gut mit dem durch die Nernst- und auch durch die erweiterte Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung berechnetem Verhalten einer ausschließlichen Kaliumpermeabilität vereinbaren (12;45).

Ausgehend von einem physiologischen pH-Wert von 7,4 erkennt man spannungsunabhängig durch extrazelluläre Ansäuerung eine Verschiebung des Ruhemembranpotenzials zu weniger negativen Werten und deutliche Hemmung mit einem pK-Wert etwa pH 6,4 und einem Maximum unter pH 5,0, während eine Verschiebung in Richtung alkalischer Werte nur noch eine geringfügige Steigerung des

gemessenen Stroms zulässt (4;12;45;54). Nach Ausschluß einer sekundär intrazellulär vermittelten Protonensensitivität gelang es, als molekulare Komponente dieses pH-Sensors einen Histidinrest an Position 98 der Aminosäuresequenz zu identifizieren, der an der Außenseite der ersten Porendomäne nahe dem Selektivitätsfilter zu liegen kommt (4;54). Weitergehende Variation der extrazellulären Lösung ergaben, dass die bivalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} vor allem die einwärtsgerichtete Komponente deutlich hemmen, während der inhibierende Einfluss von Ba^{2+} weitaus geringer ist und das Kanalprotein gegenüber Cs^+ praktisch unempfindlich ist (54). Auch weitere klassische Kaliumkanalblocker wie TEA und Glibenclamid beinflussen TASK3 allenfalls geringfügig (45). Ebenso Chinidin und Chinin inhibieren die Ströme nicht vollständig (45).

Als speziesabhängige, relativ selektive TASK3-Inhibitoren stellen sich Rutheniumrot, Zink und Lokalanästhetika, wie Lidocain und Bupivacain dar, während volatile Anästhetika einen wohl direkt aktivierenden, aber auch pH-abhängigen Effekt besitzen, der über eine konkret abgrenzbare Kombination von sechs Aminosäuren (VLRFMT) im Verbindungsstück zwischen dem vierten TMS und dem carboxyterminalen Ende geschieht, wohl auch eine Schlüsselstelle hemmender rezeptorvermittelter Signalwege (4).

So potenziert beispielsweise Halothan die Stromamplitude spannungs- und konzentrationsabhängig relativ zeitnah und anhaltend nachweisbar (45). Injizierbare Anästhetika dagegen, so auch das bereits erwähnte Lokalanästhetikum Bupivacain, inhibieren TASK3-Ströme mit einer raschen Kinetik, was sowohl Eintritt, als auch Erholung betrifft, wobei der Effekt der Allgemeinanästhetika Phentobarbital und Ketamin im Vergleich zu dem in der Tiermedizin häufig eingesetzten Alphaxalon nahezu vernachlässigbar gering ist (45). Die pH-Abhängigkeit des Zink-Blocks beruht darauf, dass eine Komponente seines molekularen Angriffspunktes am Kanalprotein identisch ist mit dem obigenannten von Protonen (13). In gleicher Weise wie die extrazelluläre Azidose, so büßt auch Zink einen beträchtlichen Teil seiner hemmenden Wirkung bei hoher extrazellulärer Kaliumkonzentration ein (13). Als zweite Voraussetzung für eine Zink-Empfindlichkeit, ebenso wie für eine Sensitivität gegenüber Rutheniumrot und anderen zweiwertigen Kationen, konnte man einen Glutamatrest an Position 70 identifizieren, der innerhalb der M1P1-Schleife zu liegen kommt und für den eine ausreichende Nähe zu His-98 nachgewiesen werden konnte (13).

Eine rezeptorvermittelte Inhibition der Kanalaktivität wird über eine Aktivierung von $\text{G}_{q/11\alpha^-}$ -Proteinen, gekoppelt beispielsweise an AT1a-Rezeptoren, möglich (4). Dabei handelt es sich um eine der vier großen Familien von heterotrimeren G-Proteinen, die jeweils von bestimmten sequenzhomologen α -Untereinheiten gebildet werden und die das Rezeptorsignal über eine Stimulation der Phospholipase C (PLC) in eine Spaltung von

Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) und Produktion von Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃) transformieren. Membrangebundenes DAG kann als second messenger PKC direkt aktivieren, im Zytosol gelöstes IP₃ führt zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration. Hiervon konnte im Falle der TASK-Regulation bisher allerdings lediglich die Erschöpfung der PIP₂-Reserven als inhibierender Mechanismus bestätigt werden, ohne dafür weitere Signalwege aufgedeckt zu haben (4). Eine gezielte Aktivierung der PKA verringerte die messbare Stromamplitude lediglich in geringem Maße (45).

Wie also bereits erwähnt gibt es Hinweise, dass sowohl hemmende, als auch aktivierende Einflüsse, wie sie über volatile Anästhetika vermittelt werden, über dieselben molekularen Strukturen vermittelt werden (4).

1.2.3 Potentielle Funktionen

Diese Beobachtungen zur Biophysik und zur Regulation von TASK3 legten in Zusammenschau mit den Ergebnissen aus Expressionsstudien bereits einige Hypothesen zu seinen Aufgaben im Rahmen (patho-)physiologischer Geschehen nahe.

Die beschriebene Detektion von TASK3-charakteristischen Strömen in Zellen, denen - so wird im nächsten Abschnitt zur Atemregulation deutlich werden - eine kritische Funktion für das Zustandekommen effektiven Gasaustauschs zugeschrieben wird und seine namensgebende, weil spezifische Eigenschaft der pH-Empfindlichkeit prädestiniert zur besonderen Bedeutung in der Atmungsregulation (33), wird aber kontrovers diskutiert (42;47).

Sein prädominantes und vor allem weites Vorkommen im zentralen Nervensystem scheint diesen Kaliumkanal für die Kontrolle des Membranpotentials von Nervenzellen besonders geeignet, ihn sogar für neuroprotektive (19), da unter anderem antiapoptotische Effekte, potenziert unter Allgemeinanästhesie, verantwortlich zu machen (42;50). Dabei wird die partielle Resistenz gegen TNF-induzierte Apoptose direkt mit der Aktivität von TASK3 korreliert und in der Folge mit Zellproliferation bis hin zur Onkogenese in Verbindung gebracht (52). So konnte in bis zu 30 % der Brust-, Lungen- und Prostatakarzinome eine TASK3-Genamplifikation als erste Kaliumkanalmutation in menschlichen Primärtumoren überhaupt nachgewiesen werden (42;52).

1.3 Konzepte zur Atmungsregulation

Genau so elementar und komplex der Begriff ‚Atmung‘, so alt und mannigfaltig auch die Theorien, die sich über ihre Physiologie und Pathophysiologie herausgebildet haben.

Während bereits pränatal eine regelrechte fetale Atmung unabdingbar ist für eine korrekte Entwicklung nervaler Strukturen und der Lunge selbst, müssen nach der Geburt jegliche Vorgänge der Ontogenese insbesondere dahingehend aufeinander abgestimmt sein, einen adäquaten Gasaustausch zu gewährleisten (21). Für diesen Reifungsprozess wird pränatal insbesondere der modulierende Einfluss noradrenerger, postnatal serotonerger Hirnstammneurone verantwortlich gemacht (22). Ermöglicht wird dies durch eine ausgesprochene Plastizität des Sauerstoffsensors während der Ontogenese (38).

Bereits Mitte des 20. Jahrhunderts versuchte man die Komplexität der Kontrollmechanismen respiratorischer Vorgänge im Rahmen des ‚Oxford‘-Modells mithilfe dreier Determinanten [1-3] zu erfassen: Eine vom Wachheitszustand abhängige basale Ventilation [1] wird in erster Linie durch zentrale [2] und periphere [3] Chemoreflexbögen modifiziert (17). Über den Säure-Basen-Haushalt stehen diese auch in kontinuierlicher Interaktion mit der renalen Exkretionsfunktion (37;46). Nach heutigem Verständnis gehören zu diesen spezifisch rückgekoppelten Reizen zum zweiten auch Mechanoafferzenzen des Atemapparates, genauso, wie eine Reihe von Atemreizen postuliert werden, die mangels der Funktion von bestimmten Sensoren kein Bestandteil eines geschlossenen Regelkreises mit dem Rhythmusgenerator sind und nicht im Sinne einer Regelung verantwortlich für die Homöostase der Atmung.

1.3.1 Zentralnervöser Schrittmacher

Diese basale Atemtätigkeit wird determiniert durch eine dreiphasige [1-3] neuronale Aktivität im Atemzentrum des unteren Hirnstamms: So kommt es nach der aktiven Kontraktion der Inspirationsmuskulatur [1] durch deren Entspannung zunächst zur passiven Exspiration [2] und schließlich durch die Arbeit der entsprechenden Muskeln zur aktiven Ausatmung [3] (21;24;56).

Im Einzelnen zu finden sind diese respiratorischen Neurone als Teil der Formatio reticularis einmal im oberen Zervikalmark, schwerpunktmäßig aber bulbär als dorsale respiratorische Gruppe im ventrolateralen Nucleus tractus solitarius (NTS), in der Umgebung des Nucleus ambiguus und die ventrale respiratorische Gruppe (VRG) in der ventrolateralen Medulla, deren rostrale Teile den Prä-Bötzinger-Komplex enthalten (21;24;55).

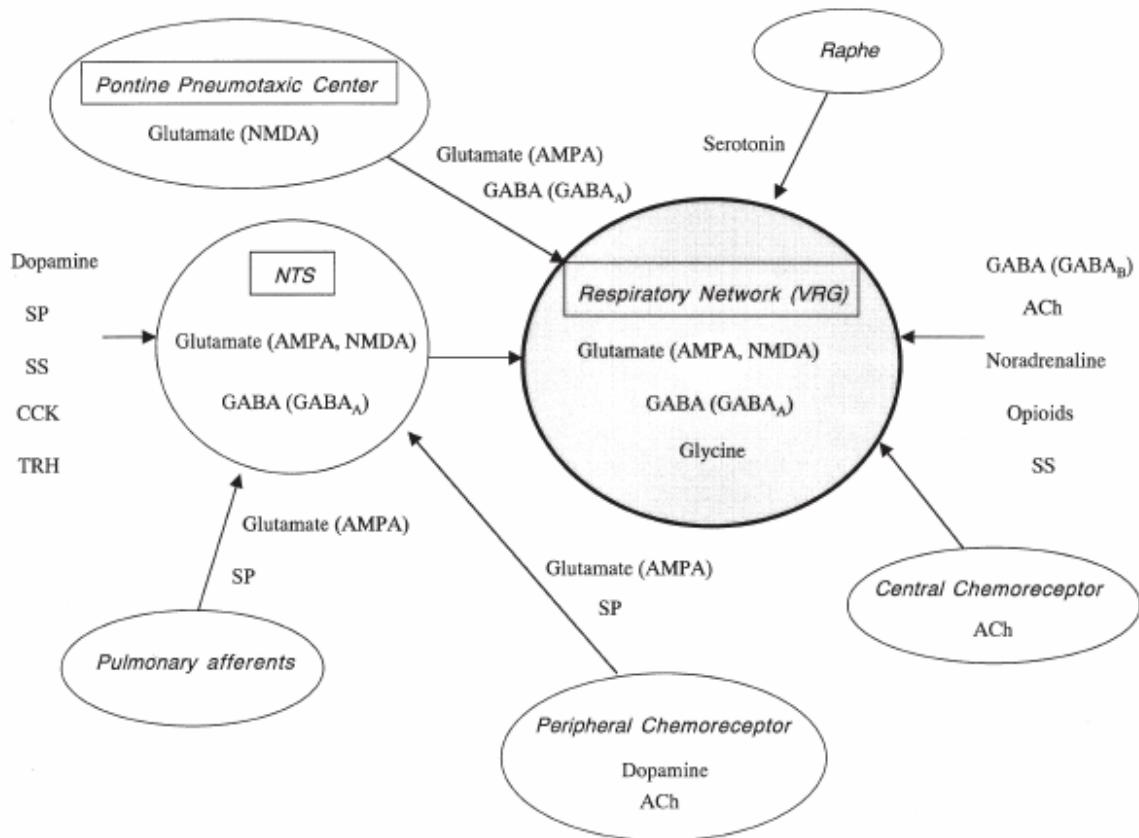


Abb. 5: Atemrhythmus und -Muster

Veranschaulicht werden Interaktionen zwischen Atemzentrum und beeinflussenden Strukturen, inklusive kontrollierender Neurotransmitter und -modulatoren (Quelle: (24)).

Während respiratorische Neurone, auf der Grundlage intrinsischer zellulärer Eigenschaften, wie selektiver Ionenleitfähigkeiten, insbesondere einen basal glutamaterg erregten Grundtonus aufweisen, führt die synaptische Verschaltung von IPSPs und EPSPs zu rhythmischen Potenzialschwankungen, die in der Folge den Ablauf eines Atemzyklus bestimmen: Dabei agieren inhibitorische Transmitter über Glycin-, GABA_A - und GABA_B -Rezeptoren, genauso wie exzitatorische Überträgerstoffe metabotrope und insbesondere ionotrope, NMDA- und nicht-NMDA-Rezeptoren (vor allem AMPA), aktivieren (21;24).

Einfluss anderer Hirnzentren. Über Neuromodulatoren nehmen andere Hirnstammregionen über second messenger wie PKA oder PKC, mannigfaltigen Einfluss auf die Atmungskontrolle: So projizieren serotonerge Neurone aus der medullären Raphe, bestehend aus Nuclei raphe magnus, pallidus, obscurus und der parapyramidalen Region, über 5-HT_{1/2/3}-Rezeptoren in die ventrale und dorsale respiratorische Gruppe und in den motorischen Kern des N. phrenicus (22;24). Bulbäre α - und β -adrenerge, inhibitorische D₂-Rezeptoren spielen gerade unter hypoxischen Bedingungen eine Rolle (24). Hauptquelle noradrenerger Einflüsse ist dabei der dem vierten Ventrikel anliegende

pontine Locus coeruleus, dopaminerige Projektionen stammen aus dem ventralen Mittelhirn (hier vor allem Substantia nigra), dem ventralen Tegmentum und dem Diencephalon (7;22). Die große Streuung in der Verteilungsdichte von Cholinozeptorsubtypen (insbesondere $M_{1/2/3}$ und verschiedene N) auf unterschiedliche Klassen von respiratorischen Nervenzellen - prä-, auch als Autorezeptoren oder postsynaptisch - macht vielfältige cholinerge Effekte möglich (24;36). Im Hirnstamm ist es allen voran das pontine Tegmentum, das im pedunculopontinen - verstreut um den Pedunculus cerebellaris superior - und laterodorsalen - angehäuft ventromedial im zentralen Höhlengrau - Kern als Teile des ARAS cholinerge Nervenzellen enthält, die sowohl bei Wachheit und im REM-Schlaf das respiratorische System tonisch wie phasisch direkt wie indirekt beispielsweise über aminerge Neurone modulieren und über eine negative Rückkopplung verfügen (36;43). Klinisch bedeutend wird der Einfluss des Schlafs auf die Atmung bei krankhaften Zuständen eines Schlafapnoesyndroms, der periodischen Atmung und dem plötzlichen Kindstod (SIDS) (36).

1.3.2 Atemreize

Zentrale Chemosensitivität. Der akut sehr wirksame und hauptsächlich zentral wahrgenommene Atemtrigger Hyperkapnie als stärkster Atemantrieb überhaupt wird zum Teil direkt über muscarinerge Cholinozeptoren vermittelt, teils über synaptische Verschaltungen indirekt auch durch nicht-cholinerge Interneurone (24). In Abhängigkeit vom cerebralen Blutfluss und von der Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für lipophiles CO_2 werden Verschiebungen der Wasserstoffionenkonzentration im Liquor durch ein System monoaminerger Neurone, insbesondere an der ventrolateralen Oberfläche der Medulla registriert (16;22;37). Im Prä-Bötzinger-Komplex erfolgt dabei ganz unmittelbar auf Änderungen im Kohlendioxid- und Protonenmilieu hin eine schnelle carboanhydrasevermittelte zellspezifische Antwort (37). Hierbei fand man, ungeachtet zahlreicher beeinflussender Faktoren wie Pharmaka oder metabolische pH-Verschiebungen, ab einer Schwelle von etwa 40 mmHg (5,3 kPa) arteriellem Kohlendioxidpartialdruck einen linearen Zusammenhang mit der Stimulation der alveolären Ventilation (16).

Eine gewisse zentral monoaminerg vermittelte Empfindlichkeit für Sauerstoffmangel mit konsekutiver Atemdepression und Sympathikusaktivierung wird mit dem medullären Nachweis der Hämoxigenase belegt, dessen hypoxieinduzierbares Isoenzym HO-1 insbesondere über sein Produkt CO als Schlüsselmediator unter anderem antiinflammatorische und antiapoptotische Effekte bewirkt (22;37;63). Auf primär durch Hypoxie verursachte extrazelluläre Azidose und die Freisetzung gewisser

Neurotransmitter kann von entsprechend ortsständig sensitiven K₂P reagiert werden (37;68) - ob dabei insbesondere TASK3 eine tragende Rolle spielen könnte - in der Literatur durchaus kontrovers diskutiert (47) - ist ein Ansatz der vorliegenden Arbeit. Der initiale hypoxische Atemantrieb wird dabei, neben einer reduzierten Aktivität der Na⁺-K⁺-Pumpe mit einer erhöhten zentralen Glutamatausschüttung erklärt, die folgende Depression durch eine lokale Akkumulation inhibitorischer Faktoren, wie GABA, Adenosin, Katecholamine, Serotonin und Opioide und Aktivierung von K_{ATP} (24).

Chemorezeptoren im peripheren Flüssigkeitskompartiment. Um ihrer derart kritischen Aufgabe als erste Sauerstoffsensoren des gesamten Organismus gerecht werden zu können, befinden sie sich an dafür entscheidenden Stellen am Austritt des Blutes aus dem Herzen und sichern durch bereits hier induzierbare Gegenregulationen im respiratorischen und kardiovaskulärem System eine optimale Versorgung seiner Peripherie (38). Repräsentativ für die einheitliche Struktur dieses chemosensiblen Gewebes bilden die an dicht fenestrierten Kapillaren in der Karotisbifurkation gelegenen, aus der Neuralleiste stammenden Typ I- oder Glomuszellen unter Zuhilfenahme von Gap-junctions und verschiedener Transmitter mit afferenten Nervenfasern des N. glossopharyngeus, deren Zellkörper im Ganglion petrosum liegen, eine sensorische Einheit. Gliazellähnliche Typ II-Zellen erfüllen Stützfunktion (15;38;53).

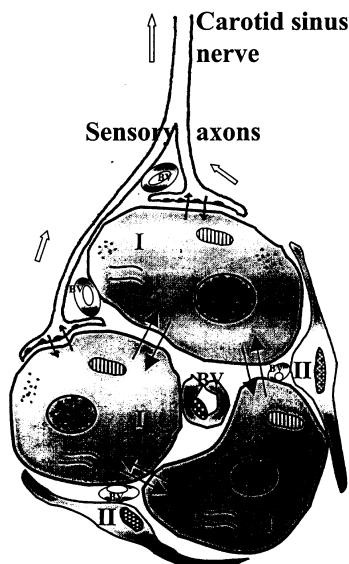


Abb. 6: Vorstellung von der neuronalen Verschaltung im Glomus caroticum

Man beachte das ausschließliche Vorkommen von Gap-junctions (↑↓) zwischen Typ I-Zellen. BV, blood vessel (Graphik aus:(38)).

Die Antwort der Glomera carotica und aortica wird zwar auch in linearer Weise von CO₂ und H⁺ modifiziert, hauptsächlich jedoch vom Sauerstoffpartialdruck bestimmt, wobei sich die Empfindlichkeiten für Hyperkapnie, aber auch umgekehrt für Hypoxie durch die jeweils

aktuell vorherrschenden Bedingungen wechselseitig beeinflussen, insgesamt ihre Hauptaufgabe also in einem Sensor für Asphyxie zu sehen ist (16;37;38;53).

So wie schon die abhängig vom Atemzyklus schwankenden Partialdrücke zwar vernachlässigbare Oszillationen der chemosensorischen Aktivität zur Folge haben, variiert auch der lokale Blutfluss an den Chemorezeptoren und damit die dort erreichten Partialdrücke (16;37).

Die bei gegebenem P_aO_2 über physiologische Bereiche linear ablaufende Chemoafferenz wird dabei zum signifikant größeren Anteil von den Karotiskörperchen gestellt und durchläuft vorwiegend im Ramus sinus carotici nervi glossopharyngei das Ganglion petrosum (8;37). Dieselben Afferenzen werden daneben auch von der Temperatur und der Osmolarität beeinflusst und stellen einen pharmakologischen Angriffspunkt dar (38).

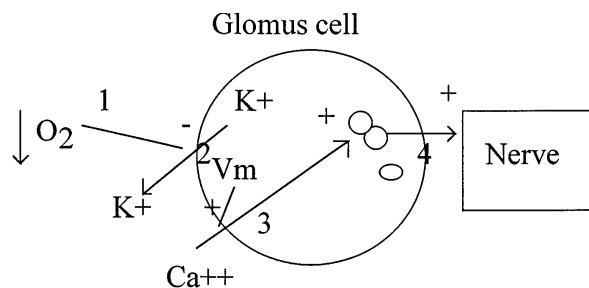


Abb. 7: Hypothese zum Transduktionsvorgang unter Hypoxie

Der hemmende Einfluss von Sauerstoffmangel auf Kaliumstrom über die Zellmembran der Glomuszelle (1) bewirkt deren Depolarisation (2) und dadurch spannungsabhängig Kalziumeinstrom (3). Der daraufhin ausgeschüttete Vesikelinhalt führt zur Entladung der anliegenden sensorischen Nervenfaser (Quelle:(15)).

Die Karotiskörperchen zeichnen sich dabei durch höchste Empfindlichkeit bei schon geringem Abfall des P_aO_2 (~100-80 mmHg), durch ihre Reaktionsgeschwindigkeit innerhalb von Millisekunden und, wenn überhaupt, nur geringste Gewöhnung an längeranhaltende Sauerstoffmangelzustände aus (38;53).

Unter plötzlich einsetzender Hypoxie wird insbesondere Komplex IV (auch Cytochrom-aa₃-Komplex oder Cytochrom c: Sauerstoff Oxidoreduktase) der mitochondrialen Atmungskette in Typ I-Zellen für die Wahrnehmung des P_aO_2 -Abfalls diskutiert: Infolge konsekutiven ATP-Mangels vermindert sich die Ca^{2+} -Aufnahme ins ER, es kommt zur Vesikelentleerung in den synaptischen Spalt (38). Auch über die depolarisierte Mitochondrienmembran selbst gelangt Kalzium ins Zytosol (38). Inzwischen verdichten sich Hinweise um TASKs, im Besonderen um TASK1, 3 und ihrem Heterodimer als O_2 -empfindliche Kaliumkanäle in der Plasmamembran von Glomuszellen an dieser Stelle erste Vermittler akuter Hypoxie zu sein (49): Die Abnahme ihrer Leitfähigkeit bewirkt Depolarisation und daraufhin spannungsgesteuerten Kalziuminflux mit folgender neuronaler Entladung (15;33;38) - hier sollen die Experimente im Rahmen dieser Abhandlung zur Klärung der Rolle von TASK3 beitragen. Neben dieser direkten Wirkung

von Sauerstoff auf die Ionenkanäle, wird auch der intrazelluläre Redoxzustand, hauptsächlich bestimmt durch den des Glutathions, mit unmittelbarer Wirkung auf das Thiol/Disulfid-Verhältnis im Kanalprotein als Mediator zwischengeschaltet (38). So werden auch in-/direkte Produzenten von reaktiven Sauerstoffspezies, wie Cytochrom P-450 und NADPH Oxidase als unmittelbare P_aO_2 -Sensoren angesehen (38).

Als bisher anerkannte synergistisch wirkende Sauerstoffsensoren für den initialen Transduktionsprozess sollen also Proteine mit Hämgruppe - wie mitochondriale Cytochromoxidasen, NADPH-Oxidasen, NO-Synthase (NOS), Hämoxygenase (HO) - gemäß Bohr je nach P_aCO_2 und pH, eine große Empfindlichkeitsbreite für unterschiedliche PO_2 -Level bewerkstelligen, während O_2 -sensitiven Kaliumkanälen die Schnelligkeit der Reaktion zugeschrieben wird (38;53). NOS und HO sollen hier über die sauerstoffabhängige Produktion von NO und CO sowohl in Zellen neuronalen Ursprungs, als auch in der Gefäßwand, überwiegend cGMP-vermittelt und inhibierend in die Vorgänge der Chemorezeption eingreifen (38).

Unbestritten jedenfalls scheint die Tatsache, dass eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration den essentiellen Schritt in der Chemorezeption darstellt (38). Dabei wird für das ionenkanalgekoppelte Sauerstoffsensing bevorzugt ein Influx von extrazellulärem Ca^{2+} , insbesondere über PKC abhängige L-Typ-Kanäle postuliert, während der Metabolismus von Hämproteinen unter Hypoxie schließlich zunächst primär in einer Entleerung intrazellulärer Speicher (Mitochondrien, ER) mündet, an einer adäquaten Antwort aber beide Quellen beteiligt sind (38).

Für den folgenden Schritt der Transmission stehen zur Aktivierung der afferenten Nervenfaser mehrere Substanzen zur Verfügung: Aus großen meist dicht gefüllten Vesikeln werden Acetylcholin, biogene Amine (insbesondere Dopamin), (Neuro)-Peptide (vor allem Substanz P (24)), atrionatriuretische Peptide, ATP und Aminosäuren Ca^{2+} -gesteuert freigesetzt und agieren über meist G-Proteingekoppelte Rezeptoren, sowohl in den Glomuszellen, als auch den Nervenendigungen (14;37;51). NO und CO interagieren, spontan enzymatisch generiert, mit zytosolischen Enzymen oder modifizieren direkt Proteine (15;38;53). Die gleichzeitige Freisetzung von exzitatorischen und inhibitorischen Mediatoren erklärt dabei möglicherweise eine fehlende Proportionalität von Transmitterfreisetzung und sensorischer Entladung und verhindert eine Übererregung mit Adaptation an den hypoxischen Stimulus (38;53). Eine kritische Rolle wird dabei in der Purinozeptorvermittelten Wirkung von ATP in seiner Relation zu ADP (insbesondere über P2X2), und möglicherweise Acetylcholin als Kotransmitter, gesehen (37;38;53).

Zentral erfolgt dann eine Stimulation insbesondere über nikotinerge Cholinozeptoren und β -adrenerg, Dopamin übt einen inhibierenden Effekt auf Chemoafferenzen aus, die fast

auschließlich im Nucleus tractus solitarius (über AMPA-Rezeptoren) enden und von dort gegebenenfalls in die ventrale respiratorische Gruppe projizieren (24).

Die Veränderungen unter prolongierter Sauerstoffrestriktion sind im Falle einer Chronifizierung vergleichbar mit den Vorgängen der Akklimatisation an die Partialdruckverhältnisse in großen Höhen (38) - in dieser Arbeit versucht die experimentelle Serie der Langzeithypoxie die Bedingungen der Höhenatmung und die bis heute noch nicht vollends aufgeklärten Vorgänge der Akklimatisation zu simulieren. Nach derzeitigem Kenntnisstand sind es die peripheren Chemorezeptoren, vor allem die Karotiskörperchen, die, selbst hypertrophiert, mit gesteigerter Empfindlichkeit den erniedrigten Sauerstoffpartialdruck wahrnehmen und mit verstärkter Neurotransmitterfreisetzung beantworten, während das durch Hyperventilation erzeugte alkalische Milieu, das nur allmählich durch die Niere kompensiert werden kann, einem möglichen zentralen Kohlendioxidgetriggerten Atemantrieb entgegensteht (37): Es kommt zur Hypertrophie von Blutgefäßen und Typ I-Zellen, deren vergrößerte Zellmembran durch eine relative Abnahme der Dichte des Kaliumstromes für dessen weitere Reduktion gleichsam sensibilisiert wird, und die Produktion - weil verminderte sauerstoffabhängige Proteolyse - zytosolischer Faktoren - als entscheidend dabei wird eine Stabilisierung des HIF-1 gesehen (37) - leiten über eine Veränderung der Genexpression eine längerfristige nukleäre Antwort auf Hypoxie ein. Im Zuge derer kommt es schließlich zu einer verminderten Empfindlichkeit der Ventilation für O₂-Mangel, da nun beispielsweise eine erhöhte Epoexpression diesen kompensiert oder eine Augmentation von Natriumkanälen andere Voraussetzungen schafft. So konnte in den Karotiskörperchen ein höherer Gehalt an TH-mRNA nachgewiesen werden, ein Enzym, das den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Katecholaminsynthese katalysiert (38). Eine derart induzierte Sympathikusaktivierung wird darüber hinaus für eine kompensatorische Erhöhung des arteriellen Blutdrucks bei obstruktiven Schlafapnoesyndrom verantwortlich gemacht (38).

Dass das periphere Kohlendioxid-Sensing ein mithilfe einer intrazellulären Carboanhydrase katalysierter enzymatischer Prozess ist und folglich intrazelluläre Ansäuerung neuronale Entladung stimuliert, bestätigt seine überschießende Dynamik: Die initiale Antwort auf Hyperkapnie übersteigt die Gleichgewichtsreaktion nach Adaptation (37). Zugrunde liegt dabei eine pH-abhängige Reduktion der Kaliumleitfähigkeit mit konsekutiver Membranpolarisation, die ihrerseits wiederum eine Stimulation spannungsgesteuerten Calciumeinstroms zufolge hat (37). Eine Hauptrolle in den Karotiskörperchen von Ratten spielt dabei das TASK1/3-Heterodimer (33). Auch diese

Prozesse unterliegen zahlreichen Einflüssen, bereits durch die Einzelzelle, die sich mit individuellen Mechanismen um pH-Homöostase bemüht (37).

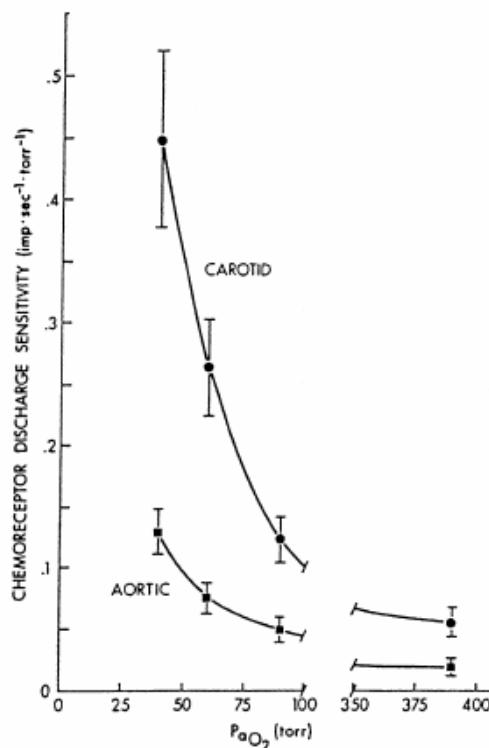
Auch in der Lunge als letztendlichem Zielorgan respiratorischer Regelkreise gilt der an sich ubiquitär vorkommende HIF-1 als Vermittler vor allem hypoxischer Einflüsse - ein Zusammenhang mit der Hyperkapnieantwort wird in der HIF-1 α -regulierten CA IX vermutet (28): Als heterodimerer Transkriptionsfaktor, dessen Untereinheiten α und β beide zur bHLH-PAS-Familie zählen und der, mangels molekularem O₂ der Degradation via Proteasom entgangen, bei Hypoxie exprimiert wird (11;37). Transloziert in den Zellkern bindet er an das HRE im Enhancer von unterschiedlichen Zielgenen, die an der Glykolyse genauso beteiligt sind, wie an der Erythropoese und Angiogenese (11;37).

Veränderungen des Kohlendioxidhaushaltes werden intrapulmonal über freie Nervenendigungen detektiert, deren Zellkörper im vagalen Ganglion nodosum, das auch Afferenzen vom Aortenbogen erhält, liegen, die ihrerseits über eine intrazelluläre CA verfügen und auch den Dehnungszustand des Lungengewebes wahrnehmen (37).

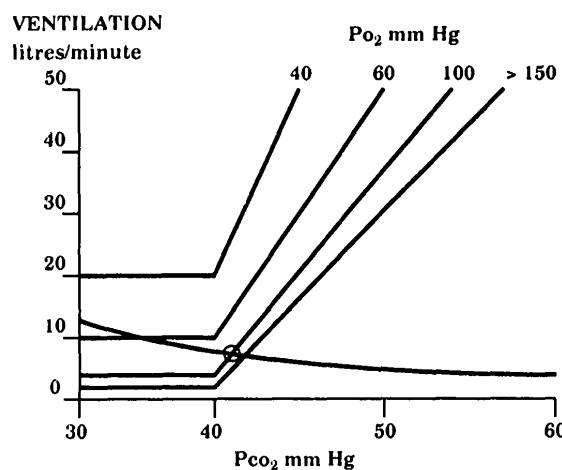
Auch den nasalen Riechrezeptoren wird eine gewisse Hyperkapnieempfindlichkeit mit inhibierendem Effekt auf die Atmung zugeschrieben (37).

Wenn auch die Sensationen des gustatorischen Apparats eher ohne Relevanz für die Respiration sind, so ist doch seine Ähnlichkeit im Vorgang des CO₂-Sensings zu den Abläufen im Gehirn und in den Glomera carotica ein Indiz für eine phylogenetisch hohe Konservierung (37).

Sowohl zentral, als auch peripher haben Gap junctions eine große Bedeutung bei der chemischen Kopplung genauso wie bei der elektrischen Synchronisierung, um intendierte konzertierte zelluläre Aktionen in ihrer Zielstrebigkeit zu verstärken (37).

**Abb. 8: Sensitivität von Chemorezeptoren**

In Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck wird die Dominanz der Karotiskörperchen verdeutlicht.
(Quelle:(37)).

**Abb. 9: Durch zentrale und periphere Chemoreflexion vermittelte Ventilation in Ruhe**

Gerade Linien: Anpassung der alveolären Ventilation an den $PaCO_2$ bei konstanten arteriellen Sauerstoffpartialdrücken (hier 40, 60, 100, >150 mmHg). Den daraus resultierenden Verlauf des $PaCO_2$ zeigt die abfallende Kurve. Mit einem Kreis ist die normale Gleichgewichtslage gekennzeichnet. (Quelle:(16)).

Mechanoafferzenzen und nicht-rückgekoppelte Atemreize. Weiterhin wird das zentral generierte Atemmuster über die peripheren Effektororgane Atemmuskulatur und Lunge seinerseits fortlaufend registriert (10;21). In den Atemwegen geschieht dies mithilfe von polymodalen C-Faser-Nozizeptoren über Substanz P im NTS (24), Dehnungsrezeptoren und Irritantrezeptoren, in der Brustwand enden Propriozeptoren und Mechanorezeptoren (10;70). Über den Hering-Breuer-Reflex nehmen vagale Mechanoafferzenzen von der

Lunge, glutamaterg im NTS insbesondere über AMPA-Rezeptoren verschaltet, Einfluss auf die Länge von Ein- und Ausatmung (24). Ihre Afferenzen modifizieren so als Feedback die Aktivität des zentralen Rhythmusgebers. Dieses breite Spektrum an Rückkopplung bedeutet ganz unmittelbar eine Vielzahl von Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Organsystemen.

Der Regler dieses autonomen Regelkreises, der Rhythmusgenerator im Hirnstamm, unterliegt dem bewussten Einfluss durch kortikale Impulse und dem Input des ARAS, das die Auswirkungen des Schlaf-Wach-Zustandes vermittelt (10;32). Für die korrekte Funktion und für Anpassungsvorgänge der zentralen Organisation der Atmungsregulation werden Interaktionen von zahlreichen neuroaktiven Stoffen postuliert, sogar respiratorische Erkrankungen, beispielsweise das Schlafapnoesyndrom und das SIDS (24), werden auf eine Störung koordinierter neuromodulatorischer Aktionen zurückgeführt. Die wichtigsten endogenen Modulatoren der Atmung sind dabei die Opioidpeptide (β -Endorphin, Enkephalin, Dynorphin), die im Hirnstamm vor allem mit cholinergen und glutamatergen Mechanismen interferieren (24). So beruhen pontine pneumotaktische Mechanismen zur Regulation des eupnoeischen Phasenwechsels auf NMDA-Rezeptoren (24). Während Opioide, aber auch Somatostatin dämpfend wirken, Substanz P und TRH die Atmung vorwiegend stimulieren, hängt der Einfluss von Cholezystokinin vom jeweilig aktivierten Rezeptorsystem ab (siehe auch Abb. 5) (24).

Weiterhin bestimmt das Herz beispielsweise die Atmungsregulation durch eine möglicherweise fluktuierende Auswurflistung, genauso wie das Gehirn durch einen variablen zerebralen Blutfluss direkt auf Basis des Chemoreflexes (32).

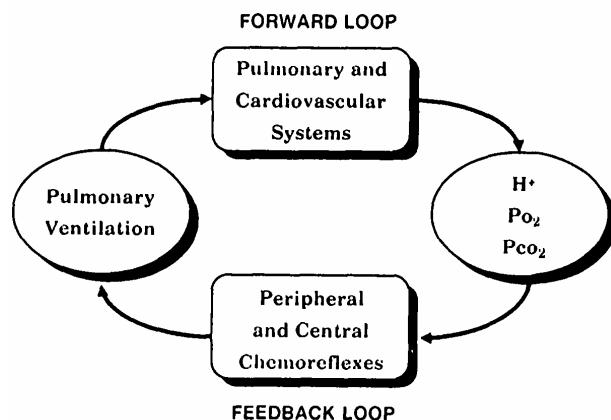


Abb. 10: Chemoreflexmechanismen zur Atmungsregulation

Mittels negativer Rückkopplung versucht die dargestellte Kontrollsleife ein bestimmtes Milieu im Sinne einer respiratorischen Homöostase aufrechtzuerhalten (Quelle:(16)).

1.4 Der TASK3-Knockout

Bei Mäusen wird die Struktur eines funktionsfähigen TASK3 durch zwei Exone festgelegt (Chromosom 15 D3) (57). Nach den Informationen von etablierten online-Datenbanken (www.ensembl.org), trennt dabei ein nahezu 33 kb langes Intron diese beiden codierenden Abschnitte in ein kleineres, 283 bp- und ein größeres, 926 bp-enthaltendes Exon, die von einer UTR flankiert werden.

Um nun die Expression von TASK3 zu verhindern, machte sich Dr. F. Lesage, IPMC, Valbonne, Frankreich, bei der Herstellung der verwendeten Knockout-Mäuse den Mechanismus der homologen Rekombination zu Nutze (23): Mit Hilfe eines Plasmidvektors, in den das gefloxierte zweite Exon (ex2) des murinen KCNK9 Gens integriert worden war, wurde dieses mittels Elektroporation in embryonale 129/Sv-Stammzellen eingebracht. Exon 2 des Wildtypallels enthält dabei Informationen für P1 und P2, M2-M4 und für das cytoplasmatische C-terminale Ende des TASK3-Proteins. Die auf den Vektor zuvor aufgebrachte Neomycinresistenz (neo) ermöglichte dabei eine nachfolgende Selektion der transgenen Tiere, die Sequenz für das Diphtherietoxin (DT) und die Thymidinkinase (TK) stellte die richtige Stelle im Genom der Mäuse sicher.

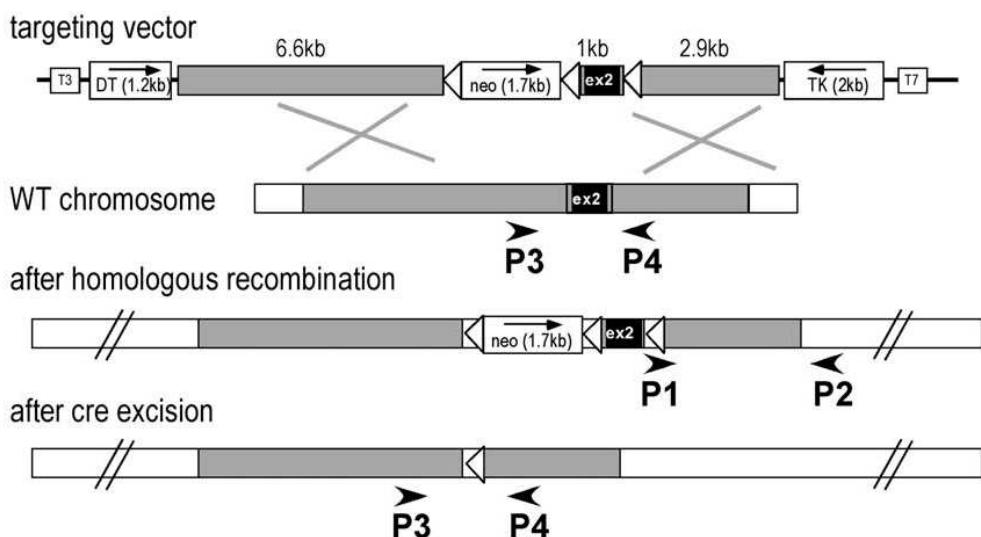


Abb. 11: Strategie der TASK3-Inaktivierung

Die mittels PCR in 3 Fragmente (6,6 kb, 1 kb, 2,9 kb) zerlegte 129/Sv-DNA wurde in einen pBluescript-Vektor mit neo, DT und TK eingebracht. Die hellen Dreiecke symbolisieren das Cre/loxP-System, d.h. eine Rekombinase mit zugehöriger Erkennungssequenz, zur nachfolgenden gezielten Entfernung von neo und ex2 (23).

Aus den durch Injektion eines derart generierten Stammzellklons in Blastozysten entstandenen Chimären, konnten, nach Verpaarung mit Wildtypen und Rückkreuzung in den C57BL/6J-Hintergrund, schließlich durch Heterozygotenverpaarung homozygote TASK3^{-/-}-Mäuse erzeugt werden.

2. Zielsetzung

Da der TWIK-related Acid-Sensitive K^+ channel **3** bisher vor allem Expressions-, elektrophysiologischen und funktionellen Lokalisationsstudien unterzogen wurde (1;4;12;31) und dabei ein signifikantes Signal resp. ein entsprechend charakteristischer Strom insbesondere in respiratorischen Hirnstammneuronen und in neuroepithelialen Zellen der Karotiskörperchen detektiert werden konnte (33;68), beschäftigt sich vorliegende Arbeit nun in erster Linie mit seiner patho- wie physiologischen Bedeutung, fokussiert auf die Regulation der Atmung *in vivo* - erstmals ermöglicht durch ein TASK3-Knockouttiermodell (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. F. Lesage, IPMC, Valbonne, Frankreich).

Unter kritischer Betrachtung vorhandener Ergebnisse zur Verteilung des Proteins im Organismus wurden zunächst eigene Untersuchungen zur Expression durchgeführt.

In Zusammenschau mit zahlreichen *in vitro* Betrachtungen zur Elekrophysiologie und Regulation von TASK3 (siehe oben, z. B. (4)), die diesen Typ von Kaliumkanal vor allem durch den pH und damit auch durch Hypoxie beeinflusst charakterisieren, wurde eine mögliche Rolle von TASK3 in der Chemorezeption angenommen. Auch durch die *ex vivo* gefundene Interaktion der großen Gruppe von Anästhetika mit dem Kanalprotein gewinnen die Versuche zum jeweiligen Phänotyp praktische Bedeutung (beispielsweise (45)): Mittels Plethysmographie wurde im Rahmen dieser Arbeit unter unterschiedlichen Bedingungen untersucht, welche Folgen ein Mangel an TASK3 für die Regulation der Atmung *in vivo* hat.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Tuttnauer 2540ELC, biomedis GmbH, Gießen, D
Diverse chirurgische Instrumente	FST, Bad Oeynhausen, D
Elektrophoresekammer	Harnischmacher, Schauenburg, D
Isofluran-Verdampfer	Vapor 19.3, Drägerwerk AG, Lübeck, D
LightCycler® System 480 Instrument Software Version 1.2	Roche, Mannheim,
Mikrotiterplatten-Photometer	TECAN Sunrise, Tecan Trading AG, CH
Oxymeter	Drägerwerk AG, Lübeck, D
PCR	Biometra, Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, D
Ganzkörperplethysmographiesystem	Emka Technologies, Paris, F
Rollerpumpe	Ismatec SA, Zürich, CH
Stereo-Mikroskop	Stemi SV 6, Zeiss, Jena, D
Thermomixer	Thermomixer 5436, Eppendorf AG, Hamburg, D
Ultratorax	DIAX 900, Heidolph Instruments GmbH&Co.KG, Schwabach, D
UV-Meter	Genova, Jenway, Essex, UK
Wärmeschrank	Modell 300, Memmert, Schwabach, D
Wasserbad	Medingen, P-D Management Industries-Technologies GmbH, Wilsdruff, D
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, D

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Druckgasflaschen	Linde AG, München, D
Gestopfte Pipettenspitzen	SorensonTM, BioScience, Inc., Salt Lake City, USA
Säulen zur RNA-Reinigung	QIAshredder, Qiagen GmbH, Hilden, D

3.1.3 Chemikalien, Arzneistoffe

Produkt	Hersteller
Agarose	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Ammoniumacetat (NH4Ac) 7,5 M	Merck KGaA, Darmstadt, D
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D

EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, NL
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, D
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Loading Dye (6x)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Marker-DNA	GeneRulerTM 1kb bzw. 50bp DNA Ladder, MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck KGaA, Darmstadt, D
TAE Puffer	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Tris HCl (Trizma® hydrochloride)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Wasser, pyrogen- und RNase-frei	MilliQ, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA

3.1.4 Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
DNase I	RNase-Free DNase Set, Qiagen GmbH, Hilden, D
dNTP-Mix	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, Wisconsin, USA
M-MLV Reverse Transkriptase Puffer (5x)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Proteinase K (aus Tritirachium album)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
QuantiTectTM SYBR Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Random Hexamer Primer (100µM)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
RED Taq Ready Mix PCR Reaction Mix mit MgCl2 (2x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
RNase Inhibitor	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
RNeasy mini kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
SYBR® Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D

3.1.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Invitrogen, Karlsruhe, D hergestellt.

Genotypsierung

Gen	Primer	Sequenz	Annealing-T.
mKCNK9 (TASK3)	sense antisense	ATGCTCTAACCTCCAGTCTG TGCGAGCTTCAGAGAGGATG	57 °C

Expression

Gen	Primer	Sequenz	Annealing-T.
mKCNK9 (TASK3)	sense antisense	ACATCAGCTCCGATGACTACC CAGGTGCAGCATGTCCATA	56 °C

m β -Aktin	sense antisense	GACAGGATGCAGAAGGAGATTACTG CCACCGATCCACACAGAGTACTT	57 °C
------------------	--------------------	--	-------

3.1.6 Puffer, Lösungen

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Menge
Tail Buffer	EDTA	0,1 M
	SDS	0,5 %
	Tris HCl (pH 8)	50 mM
	in Aqua dest.	
Tris EDTA	Tris HCl (pH 7,6)	10 mM
	EDTA (pH 8)	1 mM

3.1.7 Software

Produkt	Hersteller
IOX V1.8 Rev0	Emka Technologies, Paris, F

3.2 Methoden

3.2.1 Mäuse

Nachdem das TASK3-Konstrukt wie eingangs bereits beschrieben auf dem genetischen Hintergrund eines 129/Sv-Stammes hergestellt worden war (23), wurde also zunächst über mehrere Generationen in den C57BL/6J-Hintergrund rückgekreuzt, um durch Heterozygotenkreuzung mit größtmöglicher Wahrscheinlichkeit Reinerbigkeit annehmen zu können. So stand ein Tiermodell zur Verfügung, das - überlassen von Dr. F. Lesage, IPMC, Valbonne, Frankreich - nicht ohne diesen gezüchteten Genotyp zu verifizieren, im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde. Als sogenannte Wildtyp(TASK^{+/+})-Kontrolle setzte man Mäuse ein, deren genetischer Hintergrund auf einen C57BL/6J Stamm zurückging und dabei in ihrer Ursprünglichkeit nicht verändert wurde.

Die Tierhaltung, als auch ihr Einsatz zu Forschungszwecken, eingeschlossen der zugehörigen Wildtypen (C57BL/6J), erfolgte nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes (§11 TierSchG). Hierbei wurde für einen zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gesorgt und eine artgerechte Fütterung durchgeführt. Alle Versuchsprotokolle, zu denen mindestens 12 Wochen alte Tiere aus dem gleichen genetischen Hintergrund möglichst altersentsprechend eingesetzt wurden, wurden zuvor von der Regierung Oberpfalz genehmigt.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

Genotypisierung. Ziel einer ersten Versuchsreihe war es, die Voraussetzungen für eine valide Datenerhebung im Rahmen der TASK3 Forschung zu schaffen. So sollte die genetische Ausstattung der eingesetzten Versuchstiere überprüft werden, um eventuelle beobachtbare Abweichungen im Phänotyp auf den bekannten Genotyp zurückführen zu können.

3.2.2.1 Präparation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Zunächst wurden 300 µl Tail Buffer der in der im Materialteil dieser Arbeit beschriebenen Zusammensetzung bereits vorbereitet und bei -20 °C gelagert worden war, mit 1 µl Proteinase K (100 mg/ml) versetzt und ein Verdau eines jeweils ca. 0,3 cm langen Schwanzstückes bei 55 °C über Nacht (ÜN) angesetzt. Hierbei verdaut die aus *Tritirachium album* stammende äußerst stabile und hochreaktive Endopeptidase K nach dem katalytischen Mechanismus einer Serinprotease eine Vielfalt von Proteinen und Nukleasen, ohne dabei die Integrität der isolierten DNA zu beeinträchtigen.

Nachdem der Ansatz am folgendem Tag etwa 3 min bei 6000 rpm zentrifugiert wurde, pipettierte man den Überstand von dem zu verwerfenden Zelldetritus ab und gab ihn in ein neues Eppendorf Cup.

Der Inhalt wurde nun mit 100 µl 7,5-molarem Ammoniumacetat (NH₄Ac) vermischt. Anschließend wurde durch das Zugeben von 600 µl 100 %igem Isopropanol und einer 20-minütigen Inkubation bei -20 °C eine Fällung der DNA erreicht. Der Vorzug des NH₄Ac besteht darin, dass, anders als beim Einsatz von Natriumacetat, bei seiner Anwendung keine freien Desoxyribonukleosidtriphosphate präzipitiert werden. Die so gewonnene Suspension wurde für 10 min mit jeweils 13000 Umdrehungen ein weiteres Mal zentrifugiert.

Von den entstandenen zwei Phasen wurde nun die Flüssige verworfen und der feste, das murine Genom enthaltende pelletähnliche Niederschlag mit 1 ml Ethanol (70 %) einem nächsten Reinigungsschritt unterzogen. Nach diesem Waschvorgang zentrifugierte man den Ansatz in einem letzten Durchgang für etwa 5-10 min bei 13000 rpm, goß den Überstand erneut ab und entfernte möglichst vollständig Reste von Ethanol mit der Pipette.

Das Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend in 100 µl Tris-EDTA resuspendiert. Während des folgenden mehrstündigen Lösevorgangs bei 55 °C im Thermomixer wurde gelegentlich gevortext, um ein optimales Ergebnis zu erzielen.

Die so gewonnene und gelöst vorliegende DNA konnte nun im folgenden Versuchsgang der Untersuchung des TASK3 Genotyps der im Rahmen meiner Arbeit eingesetzten Mäuse dienen.

3.2.2.2 PCR

Zunächst aber musste der gesuchte gentragende Abschnitt der zuvor nach obigem Vorgehen isolierten DNA amplifiziert werden, um eine eindeutig detektierbare Nachweisgrenze zu erreichen.

Hierzu wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) angesetzt, eine Technik, bei der mithilfe von Oligonukleotiden, von denen jeweils zwei als ein zusammengehörendes Paar von sense und antisense Primern einen bestimmten Abschnitt auf der DNA begrenzen, diese Nukleotidsequenz vermehrt wird. Nähere Informationen zu den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primern, die Sequenz und Annealingtemperatur betreffend, werden in ihrer Gesamtheit im Materialteil aufgeführt.

Im vorliegendem Fall wurde zunächst ein Master Mix hergestellt, der je nach Anzahl n der zu untersuchenden Proben und unter Beachtung der Negativkontrolle (Kontrollprobe: keine DNA zugesetzt, nur Wasser) und etwaiger Pipettierungsgenauigkeiten insgesamt (n+2)-mal folgende Komponenten beinhaltete: 10 µl RED Taq™ Ready Mix™ PCR Reaction Mix mit MgCl₂, 2 µl Primer Mix (10 µM) und 6 µl PCR-H₂O. Zu jeweils 18 µl dieses Ansatzes pipettierte man nach sorgfältiger Durchmischung 2 µl der wie oben beschrieben isolierten genomischen und in Folge als Matrize dienenden DNA und startete die Biometra® unter Einsatz der erwähnten Kontrollprobe mit folgendem PCR Programm: Nach einer 3-minütigen Startperiode initialer Denaturierung, während der die Proben bei 94 °C inkubiert wurden, wurden zunächst vier Zyklen von jeweils 30 s Denaturierungsphase bei 94 °C, 30 s Annealingphase bei 60 °C und schließlich 80 s Elongationsphase bei 72 °C durchlaufen, an die sich 32 weitere Runden anschlossen, wobei man dann das Annealing der Primer bei 57 °C erfolgen ließ. Zum Beenden der enzymatischen Reaktion wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und auf dieser Temperatur gehalten.

Nach diesem Vorgang liegt nun in jeder DNA Probe, die jeweils dem Genotyp einer bestimmten Maus entspricht, das gewünschte Allel in ausreichender Kopienzahl vor, so dass dieses gegebenenfalls im weiteren Verlauf nachgewiesen werden kann:

Unter den hier eingesetzten Primern entsprach ein Amplifikationsprodukt von etwa 1,2 kb einem Wildtyp-Allel, eines von ca. 270 bp Länge dem Knockout-Allel. Diese galt es also nun qualitativ in ihrem Auftreten zu detektieren, um so bei ausschließlichem Vorkommen auf jeweilige Homozygotie (TASK3^{-/-} bzw. TASK3^{+/+}), bei einem nachgewiesenen Nebeneinander beider Formen auf Heterozygotie (TASK3⁺⁻) schließen zu können.

3.2.2.3 Elektrophorese

Zu diesem Zweck führt man eine Gelelektrophorese durch, bei der zuvor gegossene Agarosegele mit speziell auf die Größe der nachzuweisenden DNA Fragmente abgestimmtem Agarosegehalt und ausgerichtet auf die Probenanzahl in eine mit ausreichend Tris-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und anschließend geladen werden.

So wurden für den konkret vorliegenden Fall 1,5-%ige Gele hergestellt, indem 0,75 g Agarose in 50 ml TAE Puffer in der Mikrowelle aufgekocht wurde, bis sie sich vollständig gelöst hatte und das dabei unter Umständen verdampfte Volumen in Form von MilliQ-Wasser zugeben wurde, um ein 50 ml Falcon zu füllen.

Zu diesem Gemisch wurden dann 3 µl Ethidiumbromid, ein die DNA interkalierender und unter UV-Licht fluoreszierender Farbstoff hinzugefügt, um im Anschluss an die Wanderung der Fragmente diese sichtbar machen zu können. Diese Gellslösung wurde in eine Gießapparatur mit eingespanntem Gelträger und Kämmen, die je nach der Anzahl der Proben unterschiedliche sind, um je nach Versuchsansatz eine variable Menge und Größe an Taschen im Gel zu bewerkstelligen, gegossen, und eventuelle Luftblasen, die womöglich das Ergebnis stören, wurden beseitigt. Nachdem sich das Gel bei Raumtemperatur gefestigt hatte, wurde es im Kühlschrank aufbewahrt.

Ein solches Gel konnte nun direkt ohne einen weiteren zwischengeschalteten Arbeitsschritt mit den DNA Proben, die zuvor die PCR durchlaufen hatten, bestückt werden, da der RED Taq™ Ready Mix™ PCR Reaction Mix mit MgCl₂ u.a. bereits einen inerten roten Farbstoff in zweifacher Konzentration enthält. Außerdem wurden als Referenz eine 1 kb DNA Marker Lösung in eine Geltasche geladen und als Kontrolle eine Wasserprobe als Negativprobe mitgeführt um eventuelle Verunreinigungen auszuschließen. Die Zusammensetzung der Negativkontrolle war identisch mit der der übrigen Proben, mit dem einzigen Unterschied, dass die murine DNA durch Wasser ersetzt wurde.

Die in der PCR vermehrten DNA-Fragmente wurden nun elektrophoretisch abhängig von ihrer Größe aufgetrennt. Die so gewonnenen DNA Banden konnten nun, nachdem sich die Negativität der Kontrollprobe bestätigen ließ und nach Abgleich mit den mitgeführten Markerbanden zur Verifizierung der postulierten TASK3 Genotypen herangezogen werden. So bestätigte eine einzelne deutlich sichtbare Bande bei etwa 270 bp eine homozygote TASK3^{-/-}, im Folgenden auch Knockout-Maus genannt, eine alleinige nachweisbare Färbung in Höhe der 1200 bp Markerbande ein TASK3^{+/+}- bzw. Wildtyp-Tier und das gleichzeitige Vorkommen beider Banden eine TASK3^{+/+}- oder heterozygote Maus.

TASK3-Genexpression. Um als nächstes den Funktionsbereich, den TASK3 im murinem Organismus einnimmt einzugrenzen, wurde ein Expressionsmuster von TASK3 erstellt, d.h. die qualitative Lokalisation und auch quantitative Verteilung auf unterschiedliche murine Gewebe dargestellt.

3.2.2.4 Gewinnung von RNA aus Geweben der Maus

In dieser Absicht wurde mithilfe der Präparation der jeweils gesamten RNA aus relevanten Organen von TASK3^{+/+}-Mäusen eine Zuordnung von codierenden Sequenzen murinen Genoms zu den jeweiligen Geweben einer Wildtyp-Maus in Form eines Panel aufgestellt. Nachdem geeignete Mäuse ausgewählt worden waren, wurden diese mit Isofluran narkotisiert und durch Ausbluten getötet. Die präparierten Organe fror man in flüssigem Stickstoff ein und konservierte sie gegebenenfalls bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C. Diese orientierte sich an dem Schema, das vom Hersteller des RNeasy® Mini Kit empfohlen wird: RNase-freies Arbeiten mit Latexhandschuhen, entsprechend präparierten Einmalartikeln oder Verbrauchsmaterialien, wie DEPC-aufbereitete Lösungen, und gebackenen bzw. autoklavierten Geräten und das Arbeiten auf Eis bildet hier die Grundlage einer erfolgreichen Extraktion. Man legte die Organe zunächst in ein Gemisch aus Lysis-Buffer und β-Mercaptoethanol und homogenisierte sie unter Zuhilfenahme eines Ultratoraxes. Die so gewonnenen Lysate überführte man zur Homogenisierung auf eine QIAshredder Säule und stellte diese für 2 min bei höchster Geschwindigkeit in die Zentrifuge, wodurch RNA an das Säulenmaterial adsorbiert. Anschließend mischte man mit einer Pipette 70-%igen Ethanol unter und führte einen 10minütigen DNase-Verdau, um etwaige Kontaminationen durch DNA zu beseitigen. Die Elution der RNA erfolgte in Nuklease-freiem H₂O, wobei hier darauf geachtet wurde, dass die Zentrifugation erst mit einer Latenz von 5 min durchgeführt wurde, um eine vollständige Entfernung der RNA sicherzustellen.

Zur Qualitätskontrolle des Versuchsganges wurden die Proben zum einen auf ein 1-%iges Agarosegel aufgetragen und eine Elektrophorese gestartet, zum anderen führte man mittels Photometrie eine Konzentrationsbestimmung der RNA durch, wobei eine A260/A280-Ratio von 1,6-2,0 als Ergebnis einer 1:50 verdünnten RNA Lösung für gut befunden wurde.

Die RNA wurde bei -80 °C aufbewahrt, um sie später in copyDNA (cDNA) umzuschreiben.

3.2.2.5 Herstellung von cDNA

Dieser Umweg über die RNA Isolierung bietet also den Vorteil, dass auch wirklich nur die für die im Panel gelisteten Gewebe jeweils charakteristischen aktiv abgelesenen

Sequenzen des murinen Genoms vorliegen, die dann die Funktion des Organs determinieren, da die in genomischer DNA zusätzlich enthaltenen Introns nicht in RNA übersetzt werden. Um nun die Menge und somit das unterschiedliche konstitutive Aktivitätslevel eines Gens abschätzen zu können, muss allerdings der Vorgang dieser physiologisch ablaufenden Transkription umgekehrt werden, um eine so gewonnene cDNA (complementary DNA) als enzymatisches Substrat in eine quantitative PCR einschleusen zu können. Die Synthese dieser cDNA geschieht mithilfe einer reversen Transkriptase (rT), ein Enzym, das in der Lage ist, ausgehend von der Sequenz eines RNA-Moleküls DNA herzustellen. Die Menge der von diesem, deshalb auch als RNA-abhängige DNA-Polymerase bezeichnetem Katalysator gelieferten Kopien, kann so in einem folgendem Real-time-PCR Schritt ermittelt werden und ist der jeweiligen Genexpression direkt proportional.

So versetzte man zunächst Total-RNA mit einer entsprechenden Menge von Random Hexamer Primer (100 µM), der mit sowohl 5'- als auch 3'-ständigen Hydroxyl-Enden Startstellen für die nachfolgend eingesetzte reverse Transkriptase bietet, und füllte pro µg eingesetzte Total-RNA mit RNAse-freiem Wasser auf ein Endvolumen von maximal 14 µl auf. Nachdem dieses Gemisch einer 5-minütigen Inkubation bei 70°C unterzogen wurde, kühlte man es 5 min lang bei 4 °C. Danach fügte man zu jeder Probe folgende Komponenten hinzu: M-MLV rT 5x Reaction Buffer, dNTP Mix (10 mM je dNTP), RNAse-Inhibitor und RNAse-freies H₂O, um pro vorgelegtes µg RNA ein Gesamtvolumen von 25 µl zu erreichen. Ein so für die gesamte eingesetzte RNA hergestellte Master Mix wurde dann auf jeweils einen +rT-Versuchsansatz mit einer entsprechenden Menge an M-MLV Reverse Transkriptase (100 U) und einen Ansatz, der im Folgenden ohne Enzym unter identischen Versuchsbedingungen als Negativkontrolle (-rT-Ansatz) mitgeführt wurde, aufgeteilt. So konnten eventuelle verfälschende Verunreinigungen mit genomischer DNA detektiert werden.

Nachdem die Ansätze zunächst 10 min bei Raumtemperatur gehalten wurden, erwärmte man diese auf 50 °C, um angemessene Arbeitsbedingungen für die reverse Transkriptase zu schaffen. Nach 50 min stoppte man die cDNA Synthese, indem man die Temperatur in den Reaktionsgefäß en 15 min lang auf 70 °C einstellte.

Um eine zeitliche Latenz im Fortgang dieser Versuchsreihe zu überbrücken, wurde das so gewonnene enzymatische Produkt bei -20 °C konserviert.

3.2.2.6 Real-time-PCR

Diese Form der Polymerasenkettenreaktion ermöglicht eine mengenmäßige Erfassung des entstehenden DNA Amplifikationsprodukts, indem die Intensität eines Fluoreszenzfarbstoffs, der hochaffin an die im Reaktionsablauf gebildete DNA Doppelhelix

bindet, nach jedem Zyklus quantifiziert wird. Dabei wird der Farbstoff SYBR® Green verwendet, der nach Bindung an doppelsträngige DNA eine um den Faktor 1000 höhere Leuchtkraft aufweist als der frei in der Probe vorkommende Farbstoff. Auf diese Weise kann der exponentielle Verlauf der DNA-Vermehrung in Echtzeit, daher die Bezeichnung Real-time, gemessen werden.

Im vorliegenden Fall präparierte man die Proben mit dem QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit von Qiagen und setzte diese dann in ein LightCycler® System 480 Instrument ein: Nach dem Prinzip des n-fachen Master Mix fügte man pro Probe zu 5 µl QuantiTect™ SYBR® Green PCR Master Mix 0,5 µl Primer Mix (10 µM) und 3,5 µl RNAse-freies Wasser, um dann bei Zugabe von jeweils 1 µl Template ein Gesamtvolumen von 10 µl zu erhalten. Die Primer wurden dabei entweder so gewählt, dass die Sequenz des entstehenden Amplikons im Falle einer Verunreinigung mit genomischer DNA ein Intron einschließen würde oder einer der Primer lag jeweils zur Hälfte auf zwei verschiedenen Exonen.

Zur Kontrolle wurden neben dem -rT-Ansatz mehrere Verdünnungen (1:2, 1:5, 1:10, 1:100, 1:1000) eines Standards mitgeführt, den man aus allen im vorliegenden Experiment untersuchten Organen poolte, um die Effizienz innerhalb des Laufs abschätzen zu können. Für eine laufexterne Qualitätskontrolle wurde ein cDNA-Gemisch aus beliebigen Mausgeweben („Kalibrator“) angefertigt, das man zusätzlich bei jedem Real-time-PCR Durchgang mitführte, um gegebenenfalls die Effizienz verschiedener Läufe vergleichen zu können. Die Kapillaren wurden verschlossen und 1 min lang bei 3000 rpm zentrifugiert.

Für ein optimales Amplifikationsergebnis wählte man folgendes Programm: Zuerst erhitzte man die Proben im Sinne einer Aktivierungsphase der im Kit enthaltenen HotStarTaq™ DNA-Polymerase 15 min lang auf 95 °C, so dass dann eine DNA Amplifikation in 50 Zyklen folgen konnte. Nach einer Denaturierungsphase von 15 s bei 95 °C ließ man die Temperatur auf 56 °C absinken, um den Primern für 20 s ein Annealing zu ermöglichen. Die nachfolgende enzymatische Extension der angelagerten Oligonukleotide konnte dann für einen Zeitraum von 20 s bei 72 °C erfolgen.

Nachdem dieses Protokoll 50 Mal durchlaufen war, ließ man während einer kontinuierlichen Fluoreszenzmessung die Temperatur langsam um 0,1 °C pro Sekunde von 56 °C auf 95 °C ansteigen, um so für die entstandenen DNA-Produkte jeweils spezifische Schmelzkurven mit einem charakteristischen Verlauf zu erhalten. Schließlich wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei 40 °C gehalten.

Um die Spezifität der PCR zu überprüfen, konnten Informationen über das Schmelzverhalten der synthetisierten DNA Fragmente herangezogen werden. Außerdem führte ich mit den erhaltenen Produkten eine Gelelektrophorese durch. Nachdem die PCR

Ansätze mit 1 µl Loading Dye versetzt worden und jeweils 10 µl auf ein 3-%iges Agarosegel aufgetragen worden waren, konnte die Länge des Amplikons (147 bp) überprüft werden.

Bei der Auswertung der Daten wurde mithilfe eines weiteren Real-time-PCR-Protokolls eine Relation zur β -Aktin Expression hergestellt und so eine Normalisierung durchgeführt, um auf der Grundlage etwaiger Schwankungen in der eingesetzten Menge an Template die Ergebnisse vergleichbar zu machen. Dabei wird die Annahme gemacht, dass die Regulation des β -Aktin-Gens in entsprechenden Geweben unterschiedlicher Tiere eine jeweils relativ konstant ist.

3.2.3 Plethysmographie

Um die Lungenfunktion in Form von objektiv messbaren Parametern sichtbar zu machen und so die im Mittelpunkt des Interesses dieser Arbeit stehende Rolle von TASK3 für die Atemregulation zu untersuchen, wurde das Verfahren der Ganzkörper- oder Bodyplethysmographie angewandt.

3.2.3.1 Anordnung und Messprinzip

Im Rahmen dieser Versuchsführung wurde ein Gerät der Firma emka TECHNOLOGIES, Paris, Frankreich, verwendet, das sich standardmäßig in der Art der abgebildeten Skizze aus folgenden Komponenten zusammensetzt:

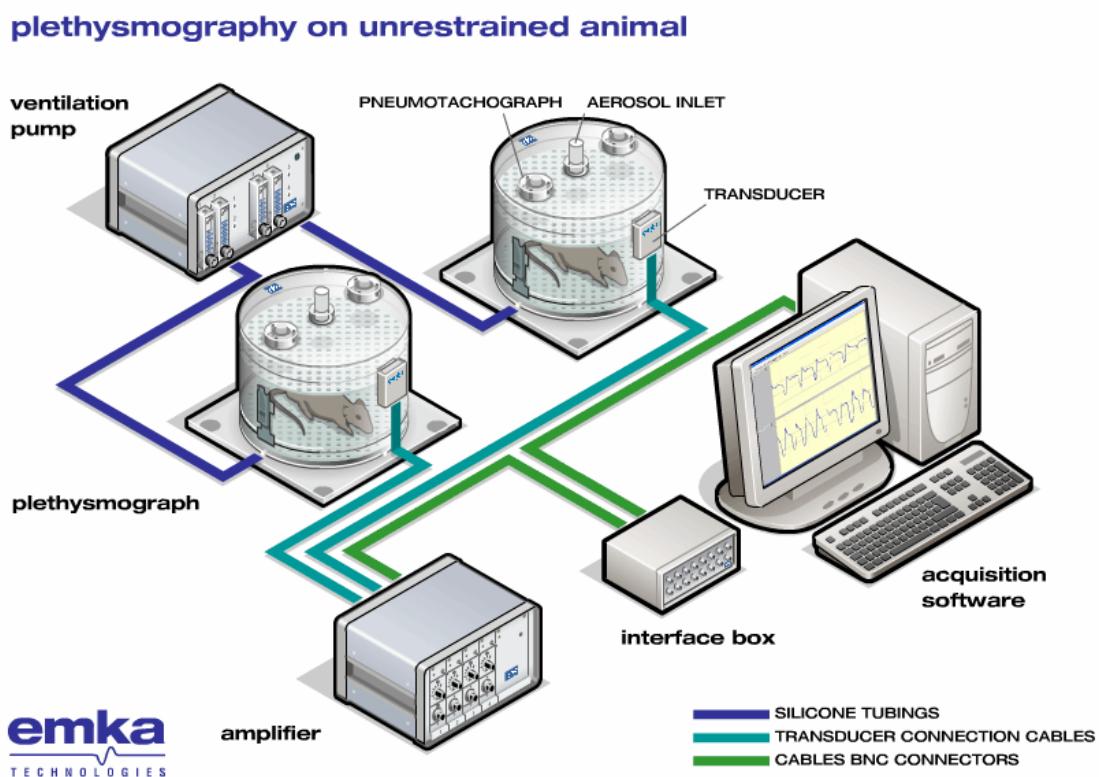


Abb. 12: Modellanordnung der Ganzkörperplethysmographen

Die Abbildung skizziert den Aufbau der Lungenfunktionsmessung wie er, um zwei Plethysmographen erweitert, bei den im Folgenden dargestellten Experimenten im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde (Quelle: Bild akquiriert von www.emka.fr).

Bei diesem relativ einfachen nichtinvasiv durchführbaren Messverfahren sitzen die Versuchstiere frei beweglich in geschlossenen Kammern, die ein bekanntes Volumen umfassen. Diese zylinderförmigen Gehäuse bestehen aus transparentem Material, so dass bei Bedarf - neben der kontinuierlichen Monitorüberwachung mithilfe der Atemkurve (siehe unten) - eine direkte Beobachtung der Tiere ermöglicht wird und eine zur Sicherheit

der Versuchstiere eventuell notwendig werdende schnelle Intervention möglich ist, um eine mögliche Gefährdung zu verhindern. Um einen kontinuierlichen Frischluft-Zu- und Abstrom (etwa 0,4 L/min) zu gewährleisten, wird daran eine Pumpe angeschlossen, wodurch die Zusammensetzung des Gasgemisches in den Kammern variiert werden kann. Die Konstruktion der zylinderförmigen Plethysmographen bietet durch das Anbringen von Trinkflaschen die Möglichkeit der Durchführung von Langzeitmessungen, die auch im vorliegenden Fall wahrgenommen wurde.

Ein Druckwandler erfasste fortlaufend Druckänderungen in der Versuchskammer, die sich in der Summe aus dem in- und exspiratorischen Luftstrom sowie der thorakalen Atemexkursion der Versuchstiere ergeben.

Die Messwerte wurden an einen Verstärker weitergegeben, der wiederum über ein Interface mit einem speziellen Computerprogramm zur Erfassung der Daten verbunden war. Hierbei wurden die Messsignale unter Zuhilfenahme von IOX V1.8 Rev0 Software, ebenfalls entwickelt von emka TECHNOLOGIES, als Druckkurve über die Zeit aufgezeichnet und analysiert. Dabei wurde je nach Länge der Versuchsperiode ein Durchschnittswert für eine Minute bzw. fünf Sekunden eingestellt. Auf diese Weise konnten eine Reihe wichtiger Atemparameter bestimmt oder berechnet werden:

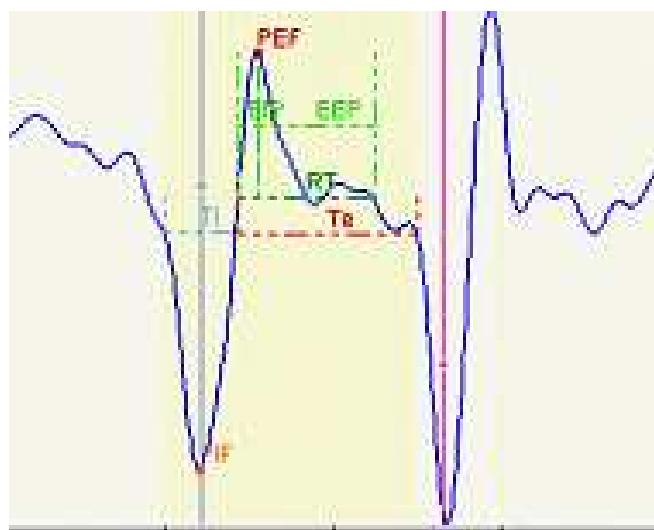


Abb. 13: Charakteristische Atemkurve

Gelb hinterlegt wurde hier der Ablauf eines Atemzyklus: Auf der Ordinate werden die Volumenänderungen gegen die Zeit (Abszisse) aufgetragen, Flächenberechnungen unter dem Graphen erlauben die Angabe von Volumenparametern. Ti: Inspirationszeit, Te: Exspirationszeit, PIF: peak inspiratory flow, PEF: exspiratorischer Spitzenfluss, EIP: endinspiratorischer Druck, EEP: endexspiratorische Druck, RT: Nur hier: Relaxationszeit (bis zum Erreichen etwa eines Drittels des Ausgangstidalvolumens) (Quelle: IOX V1.8 Rev0).

Für die zentralen Parameter gilt hierbei, dass das Tidal- oder Atemzugvolumen dem Integral über der In- (Ti) und Exspirationszeit (Te) entspricht und sich das

Minutenvolumen dem Produkt von Tidalvolumen und Frequenz (in bpm, Atemzyklen pro Minute) entspricht.

3.2.3.1 Kalibrierung und Messung

Damit diese Messwerte, die im Verlauf mehrerer unterschiedlicher Versuchsreihen gewonnen wurden, untereinander vergleichbar sind, wurde der Ganzkörperplethysmograph bei jeder neuen Inbetriebnahme kalibriert, indem ein bekanntes Volumen (1 ml) Luft in die Kammern injiziert und in Beziehung zur gemessenen Druckänderung gesetzt wurde.

Anschließend wurden die Software-Einstellungen zur Analyse der Daten auf die Streubreite der aufgenommenen Messwerte, auf das Protokoll und die gewünschten Speicherungsintervalle angepasst, um eine möglichst sinnvolle und vergleichbare Generierung der Daten zu gewährleisten.

Jede Messreihe begann zunächst mit einer ausreichend langen Gewöhnungsphase bei normaler Raumluft, während der sich die geschlechts- und möglichst altersgepaarten Mäuse in den zum Zwecke der Reizabschirmung verdunkelten Kammern befanden. Während allen Messungen wurden den Mäusen Trinkflaschen angeboten und bei Experimenten, die eine längere Dauer in Anspruch nahmen, wurden die Kammern zuvor mit Futter bestückt.

Ein in den Atemgasstrom eingeschaltetes Oxymeter wurde mittels Raumluft und reinem Sauerstoff geeicht.

Hyperkapnie. Diese wurde als hyperoxische Hyperkapnie durchgeführt, um sicherzustellen, dass es während der Hyperkapnie nicht zu atmungsrelevanten Änderungen des Sauerstoffgehalts im Atemgasgemisch kommt. Ausgehend von 100 % Sauerstoff wurde unter Kontrolle des Sauerstoffgehalts stufenweise CO₂ beigemischt.

Folgendes Protokoll wurde angewandt: Auf eine halbstündige Gewöhnungsphase bei Raumluft folgte für weitere 30 min ein Hyperoxiephase (100 % O₂) als Vorkontrolle zur Hyperkapnie. Anschließend wurde für 15 min 5 % Kohlendioxid eingeleitet und dabei die Reaktion der Versuchstiere beobachtet. Danach folgte eine 30-minütige Phase unter Hyperoxie und eine weitere Periode unter 10 % Hyperkapnie. Den Abschluss bildete eine letzte Kontrollphase bei Hyperoxie. Die Tiere wurden dabei ständig beobachtet, um bei offensichtlicher Gefährdung der Tiere den Versuch abbrechen zu können. Dies war allerdings in den von mir durchgeführten Experimenten nie notwendig.

Hypoxie. Der verminderte Sauerstoffgehalt wurde hier durch die Beimischung von Stickstoff unter Oxymeterkontrolle erreicht.

Auch hier sollten sich die Mäuse zuerst für etwa 30 min an die neuen Raumverhältnisse gewöhnen, um dann, nach einer halbstündigen Kontrollphase bei Raumluft, 120 min lang einem reduzierten O₂-Gehalt von 10 % ausgesetzt zu werden.

Stufenhypoxie. Um eine detaillierte Hypoxieantwort zu ermitteln, wurden die Tiere einer stufenweisen Reduktion der Sauerstoffspannung ausgesetzt: Nach einer Reduktion auf 15 %, 12 % und 9 % führte man die Hypoxie schließlich bis zu einem Wert von 7 % O₂ in der Einatmungsluft weiter. Nach dieser Phase einer relativ starken Hypoxie folgte eine Nachkontrollphase für weitere 30min bei Raumluft.

Langzeithypoxie. Bei diesem Protokoll zur Erfassung längerfristiger Adaptationsprozesse wurden die Tiere für 23 h der Hypoxie (10 %) ausgesetzt.

Isofluran. Das volatile Anästhetikum wurde dem Atemgas des Plethysmographen mittels Verdampfer beigemischt.

Nach der üblichen Periode der Gewöhnung und Kontrolle wurde mit einer Konzentration von 0,2 % Isofluran begonnen. Diese erhöhte ich zunächst alle 10min um 0,2 % bis 1,0 % erreicht war. Dann folgte eine letzte Konzentrationssteigerung auf 1,5 % für eine Phase von 10 min. Schließlich registrierte ich nochmals eine halbstündige Nachkontrollphase bei Raumluft.

3.2.4 Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte mit ihrer jeweiligen Standardabweichung (SEM) gezeigt. Eine Überprüfung auf Signifikanz erfolgte je nach Bedingung mit dem Student's paired respektive unpaired t-test, wobei der p-Wert $\leq 0,05$ angesetzt wurde. In den graphischen Darstellungen wurden statistisch signifikante Messwerte mit einem Sternchen markiert.

4. Ergebnisse

4.1 Expressionsmuster von TASK3

Abbildung 14 zeigt die Verteilung von TASK3 (KCNK9) in den verschiedenen Geweben der Maus. Die Real-time-PCR-Daten wurden auf das housekeeping-Gen β -Aktin normalisiert. Das Ergebnis ist in Einklang mit den Untersuchungsergebnissen anderer Gruppen (1;4;12;30). TASK3 ist besonders stark in der Nebenniere und im zentralen Nervensystem exprimiert, allen voran Hirnstamm und Kleinhirn, aber auch in Rückenmark und Großhirn.

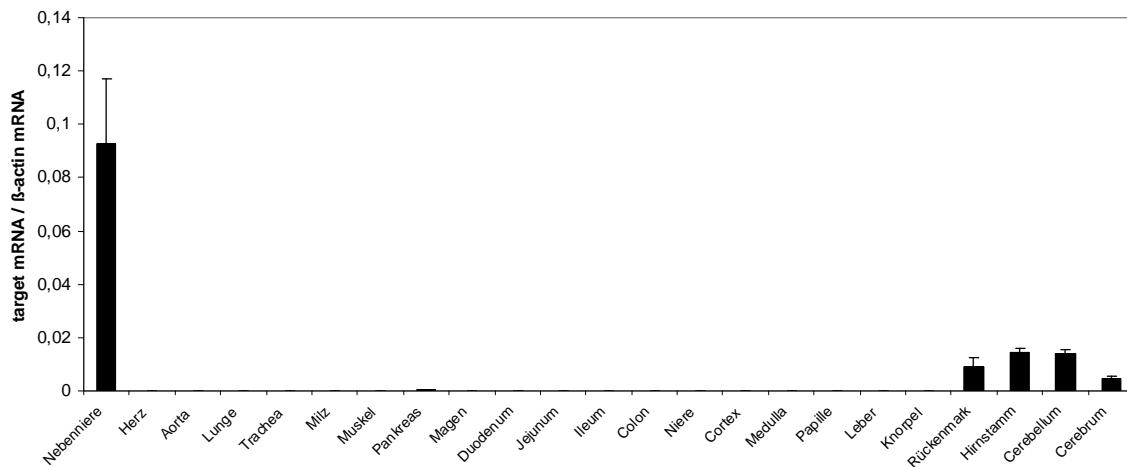


Abb. 14: mRNA-Expressionsmuster des murinen TASK3 mittels Realtime-PCR

4.2 Phänotyp der TASK3^{-/-}-Maus: Respiration

Wie eingangs bereits ausführlich dargelegt, weisen die Ergebnisse zahlreicher *in vitro*-Untersuchungen auf eine möglicherweise tragende Rolle von K2P-Kanälen in den komplexen zentralen und peripheren Vorgängen der Atmungsregulation hin. Das Tiermodell der TASK3-Knockout-Maus ermöglichte es nun im Rahmen dieser Arbeit *in vivo*-Studien durchzuführen und so mithilfe der Ganzkörperplethysmographie die Beteiligung von TASK3 an der Regulation der Atmung zu untersuchen.

4.2.1 Hyperkapnie

Wie bereits ausführlich erläutert wird akuter Kohlendioxidanstieg der Einatemluft vorwiegend zentral, weniger peripher, wahrgenommen, worauf aufgrund der relativ verringerten Pufferkapazität des Liquors eine bis zu zehnfache Steigerung der Ventilation möglich ist, was CO_2 zum stärksten Atemreiz macht. Sowohl seine Lokalisation im Hirnstamm und in peripheren Chemorezeptoren, als auch seine bekannte Säureempfindlichkeit, legen nahe, dass TASK3 hierbei eine Bedeutung haben könnte. Deshalb wurde nach der oben beschriebenen Methodik ein hyperkapnisches inspiratorisches Gasgemisch generiert und das bereits beschriebene Protokoll auf weibliche und männliche Tiere isoliert angewandt. Der Atmung von $\text{TASK3}^{-/-}$ -Mäusen unter Hyperkapnie wurde mit der von Wildtypmäusen verglichen, um eine mögliche Rolle von TASK3 bei der CO_2 -Atemantwort zu ermitteln.

4.2.1.1 Männliche Mäuse unter Hyperkapnie

Die CO_2 bedingte Stimulation der Respiration erfolgt unabhängig von TASK3. Anhand der graphischen Darstellung der entscheidenden Variablen Tidalvolumen, Frequenz und Minutenvolumen (Abb. 15: (B), (C), (A), jeweils $n=8$) lässt sich die hyperkapniebedingte Hochregulation der Atemtätigkeit nachvollziehen, wobei beide Genotypen ($\text{TASK3}^{-/-}$ und Wildtypmäuse) nahezu identisch reagieren: Unter Zufuhr von 5 % Kohlendioxid steigt das Minutenvolumen (A) verglichen mit der Kontrollphase (Kon) zunächst jeweils rund um das 2,5-fache an, unter 10%-iger Hyperkapnie schließlich auf etwa das 3-fache der Ausgangswerte. Diese Zunahme beruht konsistent vor allem auf einem vergrößerten Atemzugvolumen (B), weniger auf häufigeren Atemzyklen (C). Interessanterweise erfolgt die Regulation des Tidalvolumens offensichtlich schneller als die der Atemfrequenz. Auch in der Erholungsphase normalisiert sich das Tidalvolumen rascher als die Atemfrequenz.

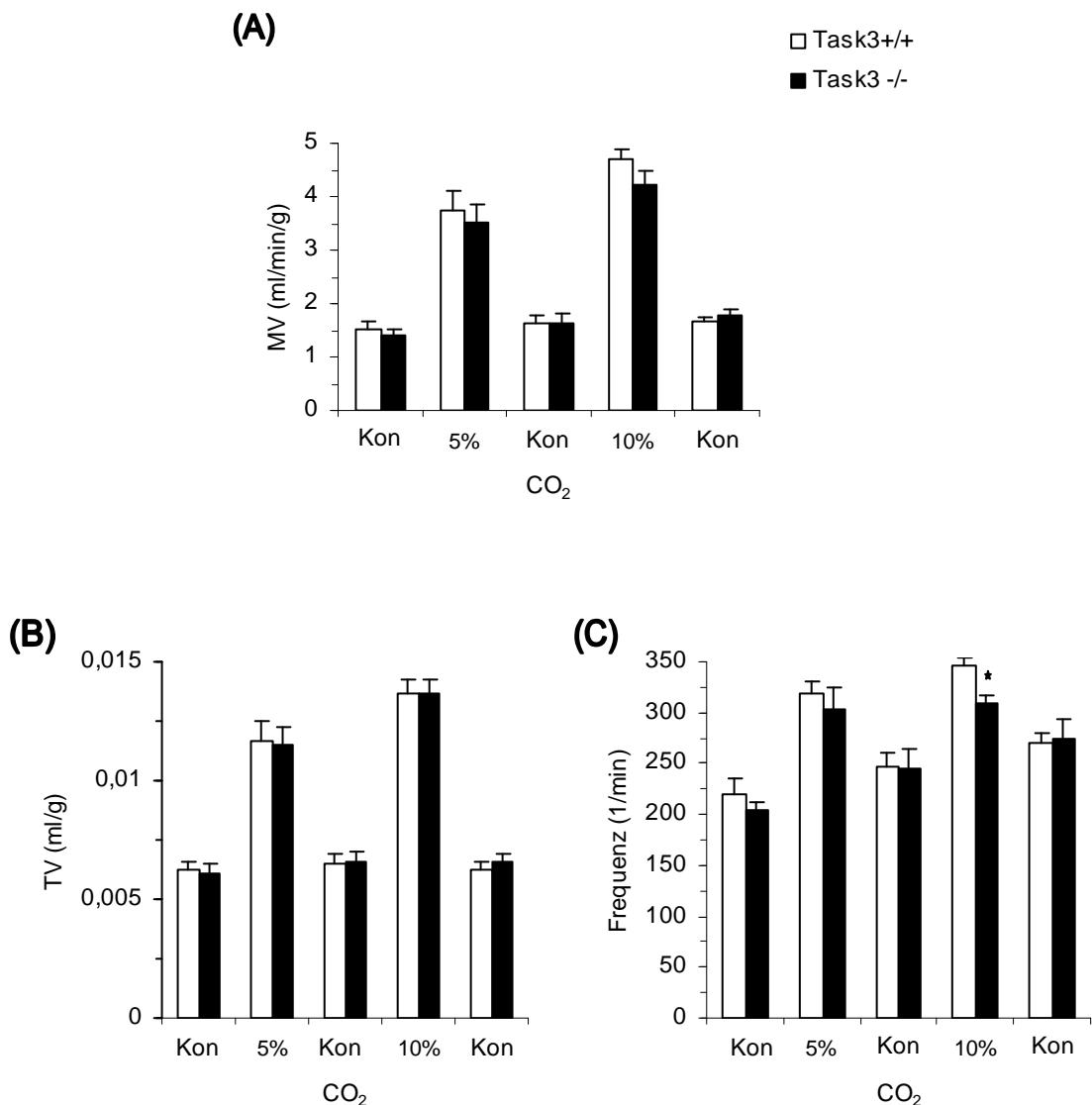


Abb. 15.: Hyperkapnie Männchen – MV, TV, Frequenz

(A-C) Sowohl 5 % als auch 10 % Kohlendioxid in der Einatmungsluft beeinflussten die Atmungsparameter der beiden Genotypen (jeweils n=8) praktisch in gleicher Weise.

Bei hoher inspiratorischer CO₂-Konzentration ist der Frequenzanstieg bei Knockoutmäusen abgeschwächt. Bei einer weiteren Erhöhung der Kohlendioxidzufuhr (10 %) fielen die männlichen Versuchstiere durch einen niedrigeren Anstieg der Atemfrequenz auf, die von einer Verlängerung beider, sowohl der inspiratorischen (Abb. 16: (D)), als auch der exspiratorischen Phase eines Atemvorgangs (Abb. 16: (E)) herrührte. Dies könnte auf eine möglicherweise durch TASK3-Mangel abgeschwächte Antwort bei sehr starker Hyperkapnie hindeuten. Auch wenn der kleine Effekt statistisch signifikant war, so bleibt doch seine biologische Relevanz zweifelhaft.

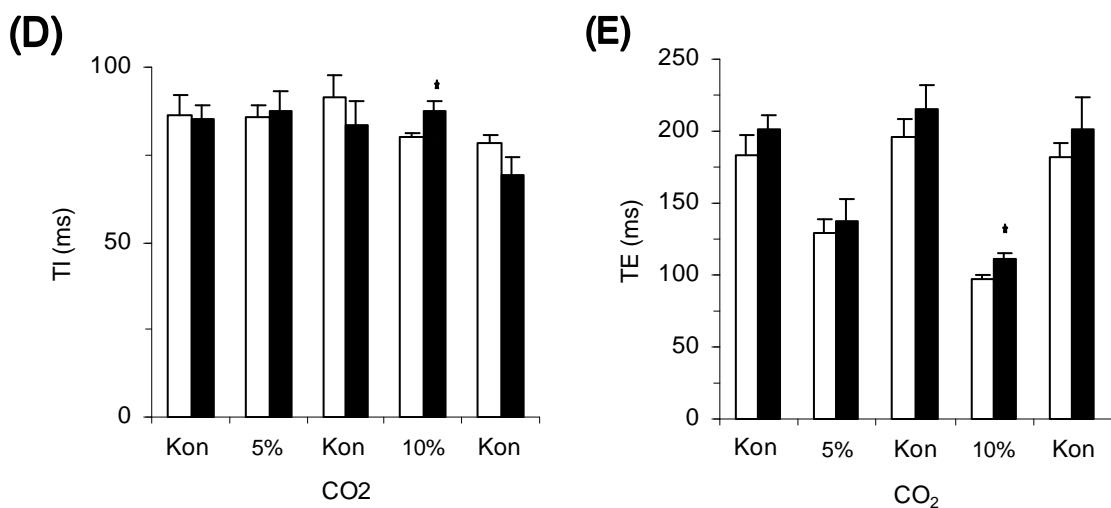


Abb. 16: Hyperkapnie Männchen: TI, TE

(D-E) Unter 10%-iger Kohlendioxidatmosphäre zeichnet sich ein TASK3-spezifisch verändertes Atemmuster ab.

4.2.1.2 Weibliche Versuchstiere unter Hyperkapniebedingungen

Ausgehend von einem nur leicht erhöhten Ruheniveau erfolgt die Anpassung an den erhöhten CO₂-Gehalt des Atemgases bei den TASK3^{-/-}-Weibchen in gleicher Weise wie bei Wildtypieren (jeweils n=4). So ist auch hier der signifikante Anstieg des Minutenvolumens (Abb. 17: (A)) insbesondere auf eine signifikant tiefere Atmung (erhöhtes Tidalvolumen in Abb 17: (B)) zurückzuführen, während der Anstieg der Atemfrequenz einen etwas geringeren Beitrag leistete (Abb. 17: (C)).

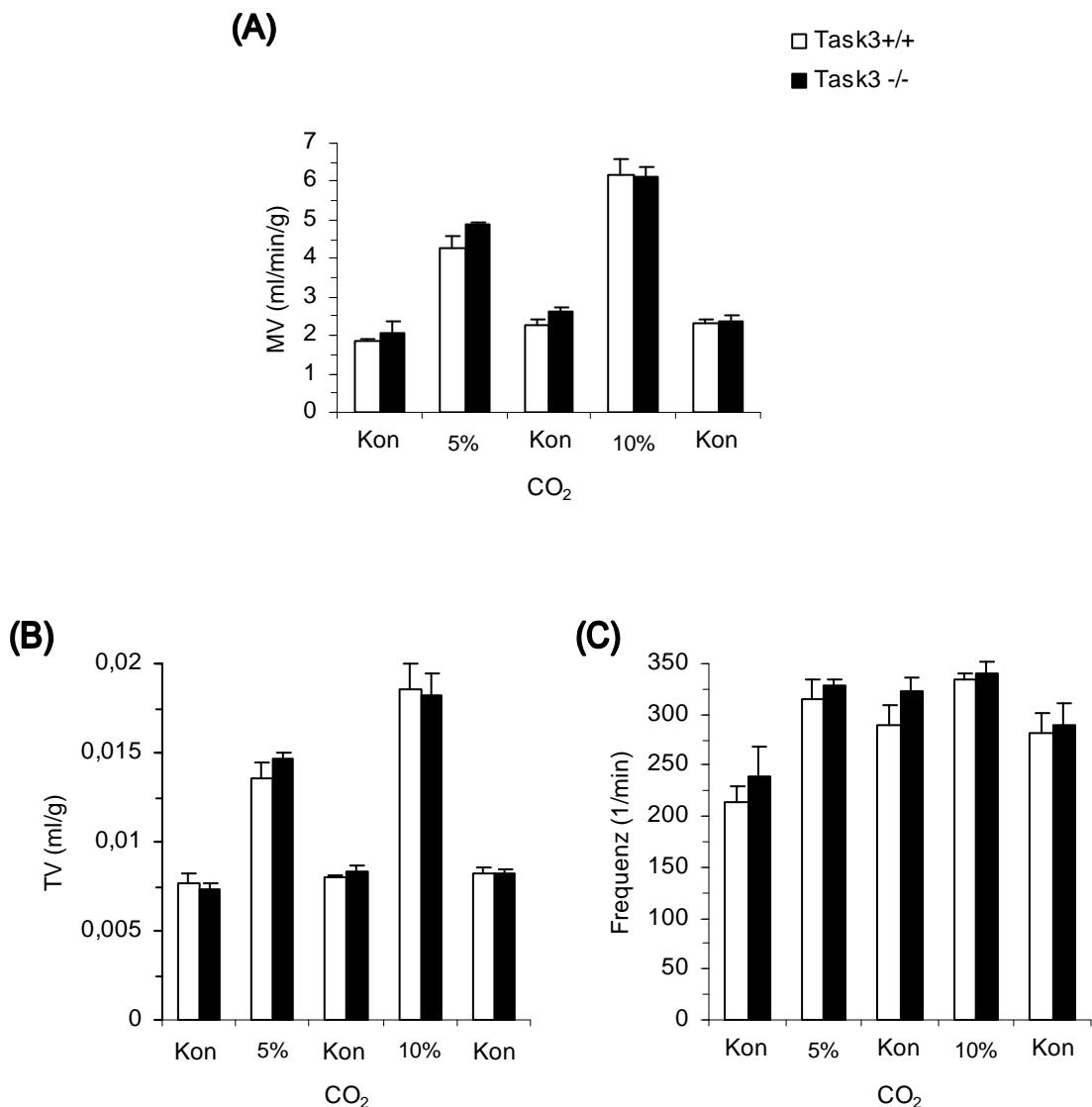


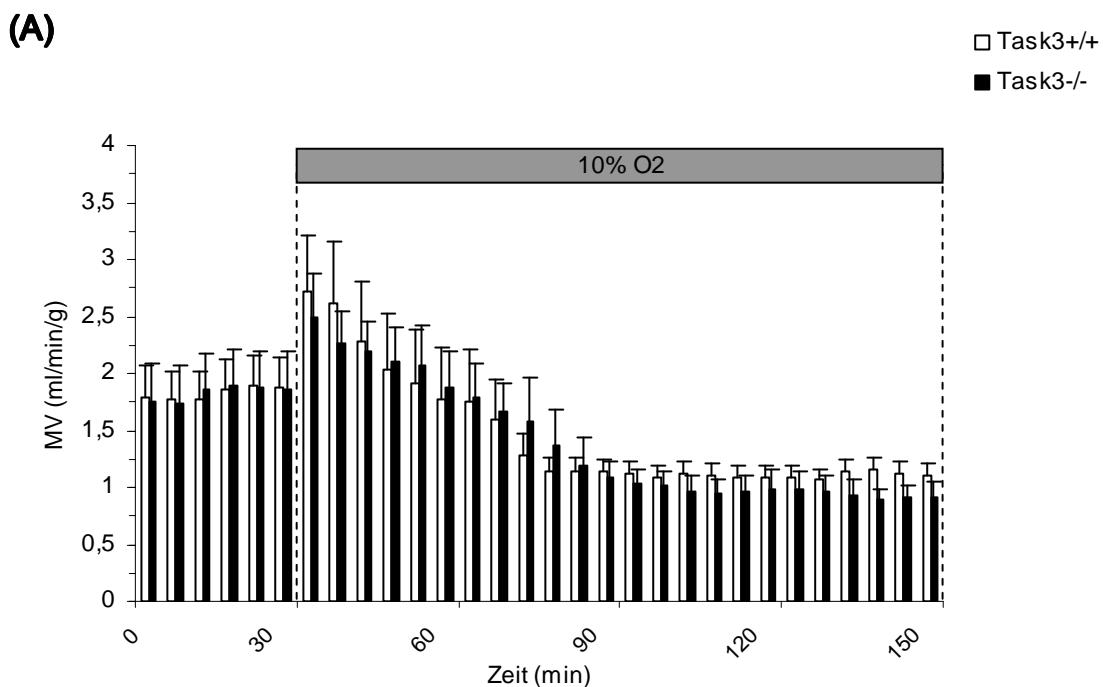
Abb. 17: Hyperkapnie Weibchen: MV, TV, Frequenz

(A-C) CO₂ führte bei Wildtyp- und TASK3^{-/-}-Tieren (jeweils n=4) in gleicher Weise zu einer verstärkten Atmung.

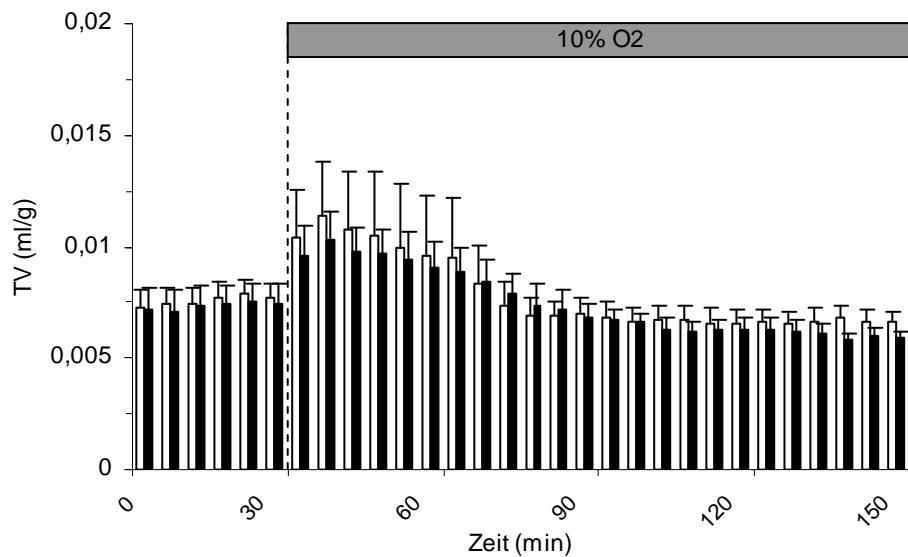
4.2.2 Hypoxie

Es ist bekannt, dass die Wirkung von Hypoxie als Atemstimulus schwächer ist als die von Hyperkapnie: Erst eine deutliche Sauerstoffverarmung des Blutes führt nach Registrierung in den peripheren Chemorezeptoren zu einer nur etwa maximal dreifach gesteigerten Ruheatmung. Experimentell ergibt sich bei Hypoxieexperimenten allerdings das Problem, dass die Hypoxie-induzierte Mehratmung zu einem vermehrten Abatmen von CO_2 führt. Diese respiratorische Alkalose senkt ihrerseits den Atemantrieb und trägt zu der Atemdepression bei, die bei längerer Hypoxie zu beobachten ist.

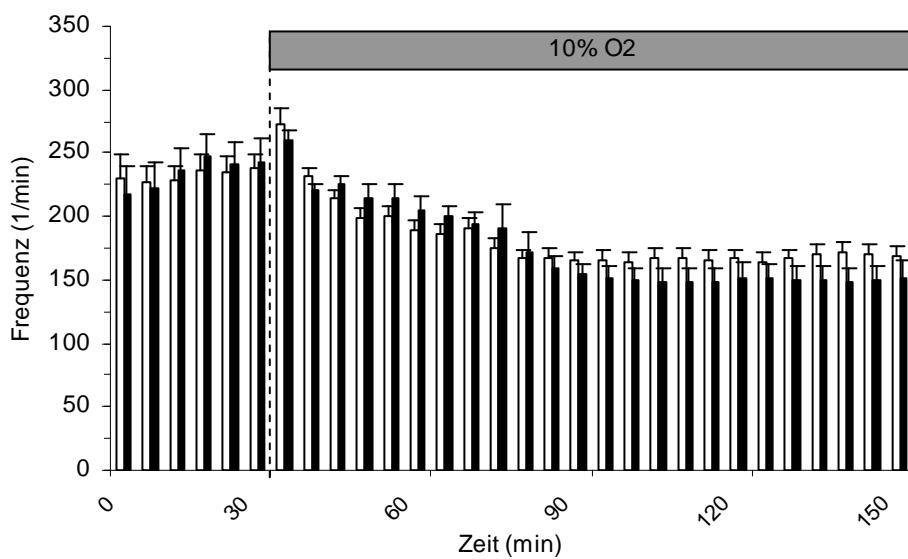
In einer zunächst auf zwei Stunden begrenzten Hypoxiephase war bei Männchen (Abb. 18: Versuchs- und Kontrollgruppe jeweils $n=8$) und bei Weibchen (je $n=4$) die reaktive Mehratmung, erneut am meisten durch ein größeres Tidalvolumen verursacht (siehe Abb. 18 (B)), nicht nennenswert verschieden. Es zeigt sich lediglich die Tendenz einer initial abgeschwächten Atemantwort auf Hypoxie bei den Knockouttieren. Auch die im Folgenden einsetzende physiologische Atemdepression tritt gleichermaßen ein.



(B)



(C)

**Abb. 18: Respiratorisches Verhalten der Männchen unter akuter Hypoxie**

Nahezu identischer Verlauf von Minutenvolumen (A), Atemzugvolumen (B) und Frequenz (C) (je $n=8$).

4.2.2.1 Initialphase der Hypoxie bei männlichen Mäusen

Leichte Unterschiede bei TASK3-Knockouttieren unter akuter Hypoxie. Schon unter Hyperkapnie deutete sich eine Destabilisierung des Atemmusters von TASK3-defizienten männlichen Mäusen ab, die sich hier ebenfalls, wenn auch etwas andersartig manifestierte. So konnten die TASK3^{-/-}-Mäuse trotz eines verminderten Sauerstoffgehalts des Inspirationsgemisches ihre Einatmung nicht in demselben Ausmaß verlängern wie die Wildtypen (Abb. 19: (A)). Die Ausatemzeit zeigt einen dreiphasigen Verlauf: Initial ließen sich die TASK3^{-/-}-Tiere dabei mehr Zeit für die Entleerung ihrer Alveolen (Abb. 19: (B)), nach einer Stunde näherten sie sich dem Wildtypniveau an, um nach 90 Minuten wieder deutlich verlängert auszuatmen. Auch wenn der wichtigste Parameter, das Minutenvolumen, kaum verändert war, so zeigen die knockoutabhängigen Veränderungen der Ein- und Ausatemzeit, dass das Muster der Atmung bei beiden Genotypen unter Hypoxie nicht identisch ist.

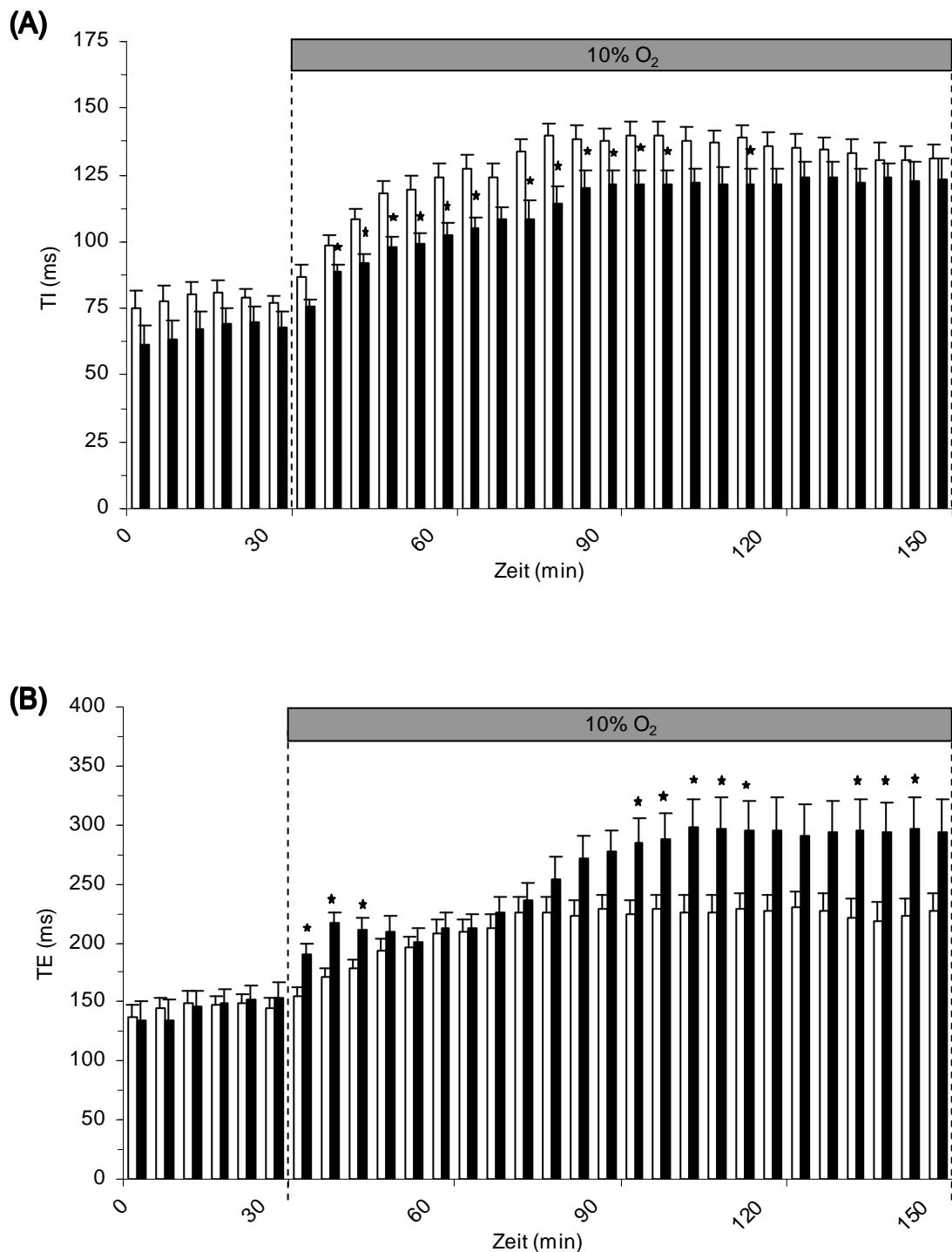
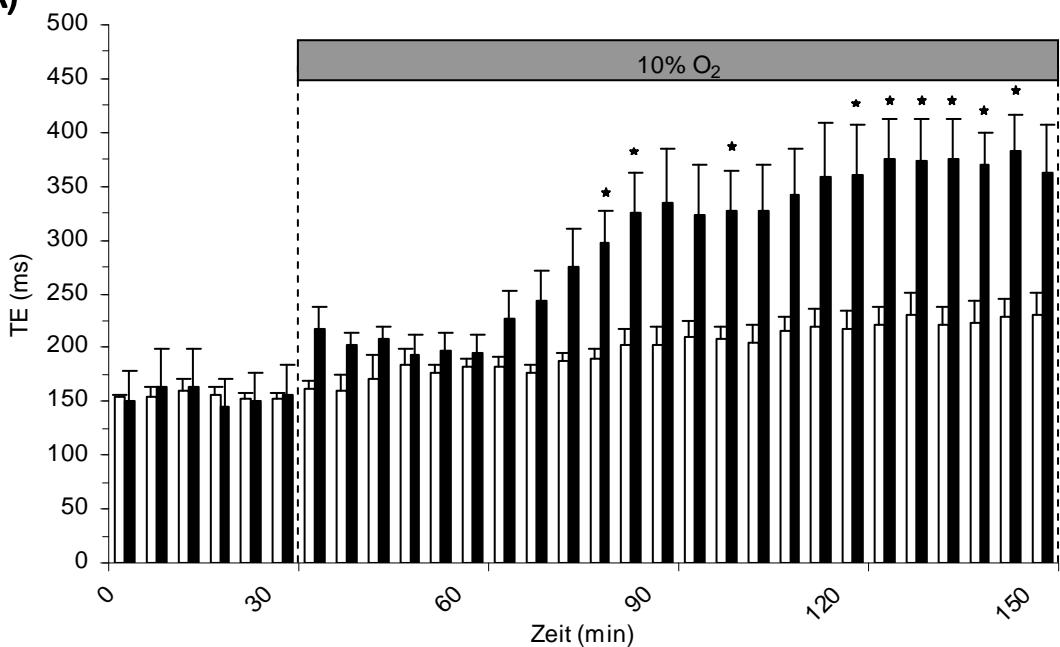


Abb. 19: Ein- und Ausatmungszeit der Männchen unter Hypoxie

(B-C) In den ersten zwei Stunden verminderten Sauerstoffangebote führten eine deutlich kürzere Inspiration, gemeinsam mit einer prolongierten Expiration zu einem veränderten Atmungsmuster der Knockout-Mäuse, ohne dabei Einfluss auf kritische Parameter der Respiration zu nehmen (jeweils n=8).

4.2.2.2 Die schnelle Hypoxieantwort der Weibchen

(A)



(B)

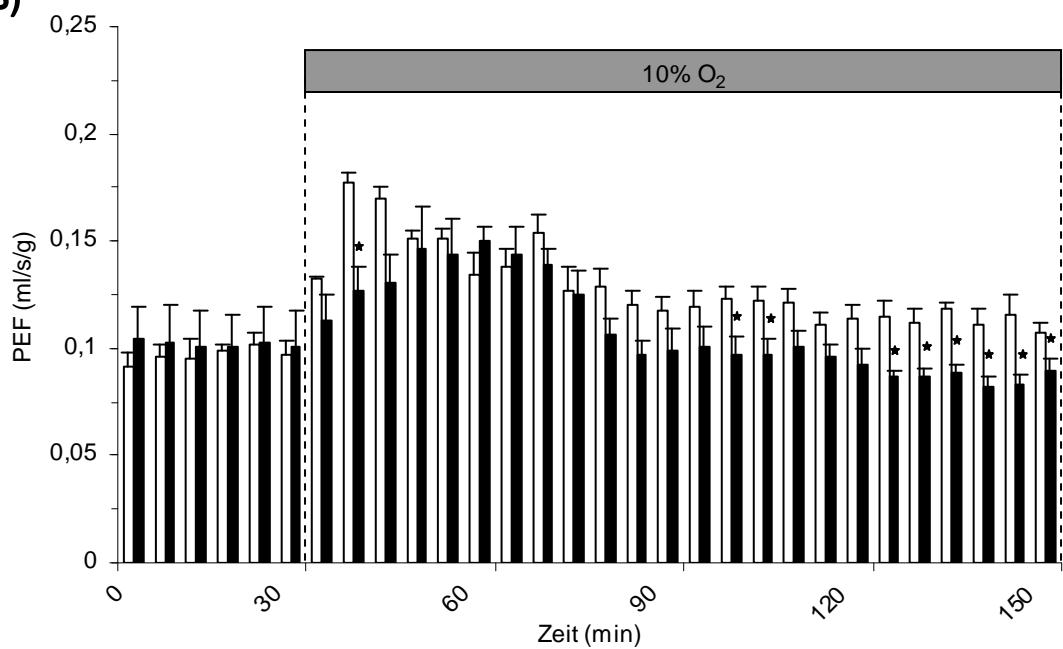


Abb. 20: Exspirationszeit und Spitzenfluss von Weibchen unter Sauerstoffmangel

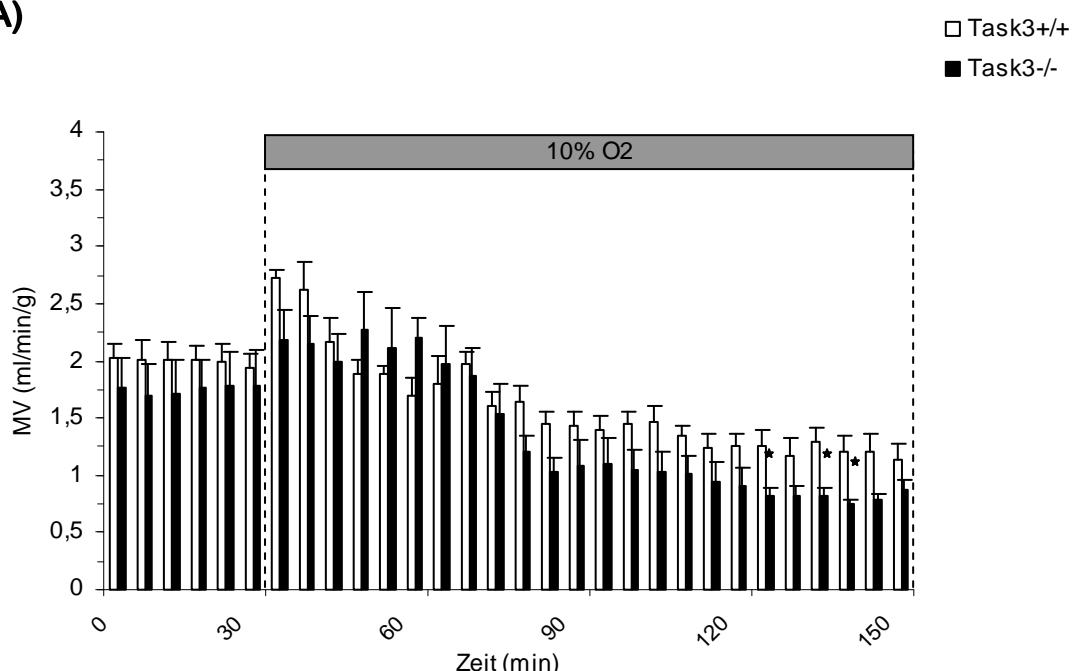
(A-B) Weibliche *TASK3^{-/-}* atmeten, ähnlich wie die gegengeschlechtlichen Tiere lediglich im Sinne eines phänotypisch unterschiedlichen Respirationsmusters in dieser kurzen Hypoxiephase deutlicher verlängert und weniger forciert aus, mit nur punktuell nachweisbaren, keinesfalls konsequenteren Auswirkungen auf das Minutenvolumen (Abb. 21) (jeweils n=4).

Das Respirationsmuster wird beinflusst vom TASK3-Genotyp und dem Geschlecht.

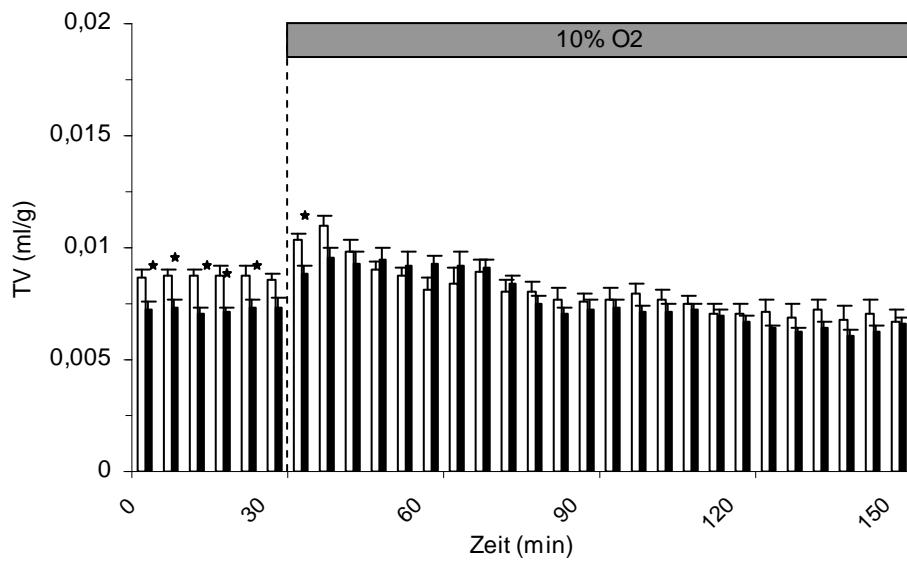
Wie aus Abb. 20: (A-B) ersichtlich, ist die Art und Weise der Umstrukturierung der Atmung ein geschlechtsabhängiges Ergebnis der TASK3-Defizienz. So lassen hier insbesondere die Ausatmungszeit und der dabei erreichte Fluss nennenswerte Auswirkungen des Knockouts erkennen. Bei einem um ein Viertel der Kontrollgruppe reduzierten exspiratorischen Spitzenfluss (B) brauchten die Knockoutmäuse in der letzten halben Stunde um zwei Drittel mehr Zeit für die Ausatmung (A) als die Wildtypiere.

Der quantitative Unterschied schon unter Ruhebedingungen (Abb. 21 (B)) und die scheinbar stärkere Tendenz zur hypoxischen Atemdepression (siehe Abb. 21 (A)), hier mehr frequenzbedingt (Abb. 21 (C)), muss unter dem Aspekt der eher geringen Anzahl an weiblichen Versuchstieren in seiner Bedeutung kritisch betrachtet werden.

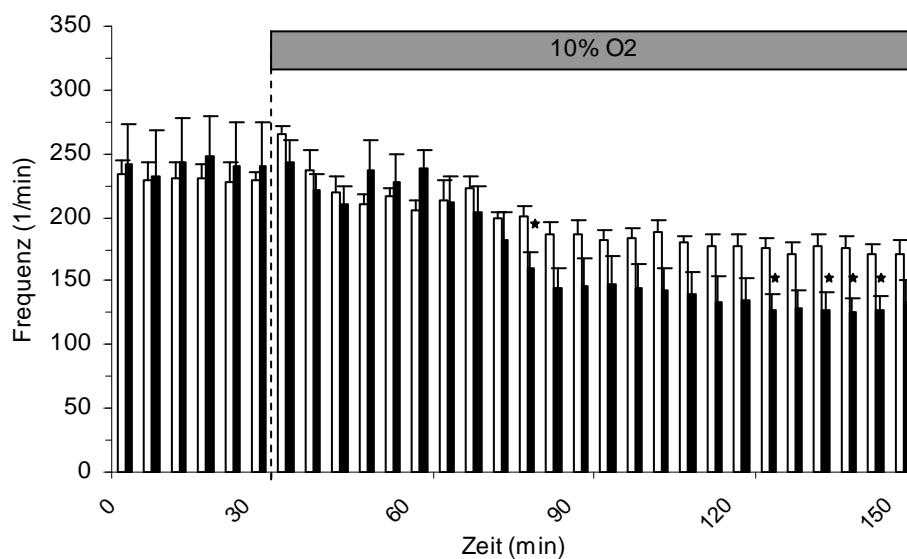
(A)



(B)



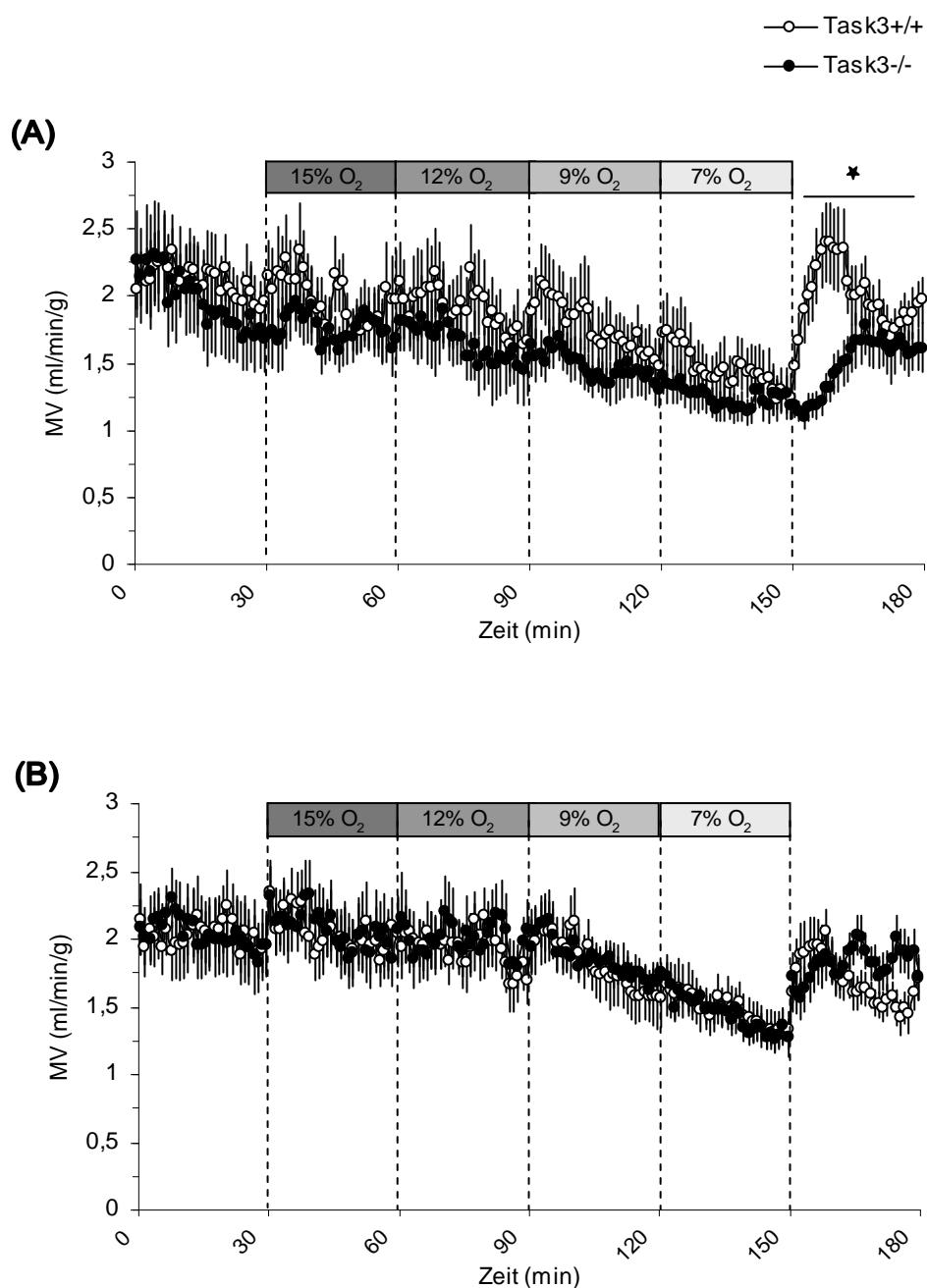
(C)

**Abb. 21: Weibchen unter Hypoxie: MV, TV, Frequenz**

Einzelne Unterschiede müssen im Hinblick auf die eher geringe n-Zahl in ihrer Relevanz kritisch betrachtet werden (je n=4).

4.2.3 Stufenhypoxie

Unter stufenweiser Absenkung der inspiratorischen Sauerstofffraktion lässt sich die bereits beschriebene Dynamik hypoxischer Wirkung auf die Ventilation in ihrem konzentrationsabhängigen Verlauf nachvollziehen: Dem anfänglichen Peak folgt bei zunehmend höhergradigem Sauerstoffmangel eine gegenläufige Abnahme des Atemminutenvolumens.



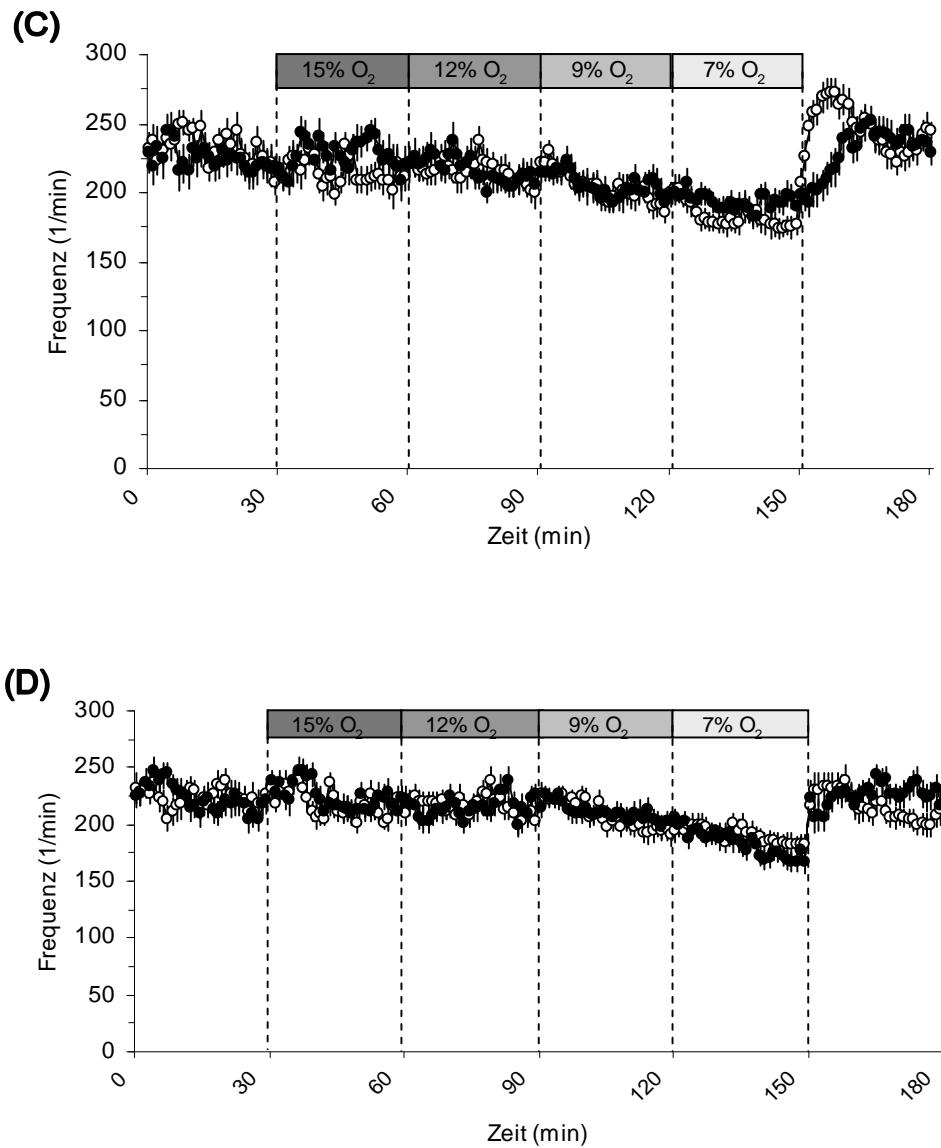


Abb. 22: Sukzessive Reduktion des Sauerstoffgehalts – MV, Frequenz

In Gegenüberstellung der Männchen (A und C, TASK3^{+/+} n=13, TASK3^{-/-} n=11) mit den weiblichen Versuchstieren (B und D, TASK3^{+/+} n=15, TASK3^{-/-} n=13) zeigen sich die globalen Parameter Minutenvolumen (A und B) und Frequenz (C und D) nicht verschieden zwischen den Genotypen.

4.2.3.1 Stufenweise Sauerstoffreduktion – Männliche Versuchstiere

Tendentiell verminderte Antwort des Minutenvolumens. Auch eine fraktionierte, sogar noch weitere Absenkung des inspiratorischen O₂-Volumenanteils bis auf 7 % brachte zwar keinen signifikanten Unterschied, jedoch erneut eine verstärkte hypoxische Depression zu Tage, die auf den fehlenden Kaliumkanal zurückgeführt werden könnte. Bemerkenswert ist zudem die bei den männlichen Knockout-Tieren (n=11) zu beobachtende träge Erholung in der Nachkontrollphase (Abb. 22 A und C).

Mit dem Grad der Hypoxie steigt die Tendenz zur Umstrukturierung des Atemzyklus. In Abbildung 23 deutet sich graphisch sichtbar bereits bei 12-%iger Hypoxie zwischen den TASK3^{+/−} und der Kontrollgruppe (n=13) eine genotypabhängige Dissoziation der PEF-Kurve an, deren Werte dann bei stärkerem Sauerstoffmangel signifikant differieren: Wildtyp-Mäuse zeigen hypoxieinduziert eine Erhöhung des Ausatemflusses, Knockout-Tiere nicht.

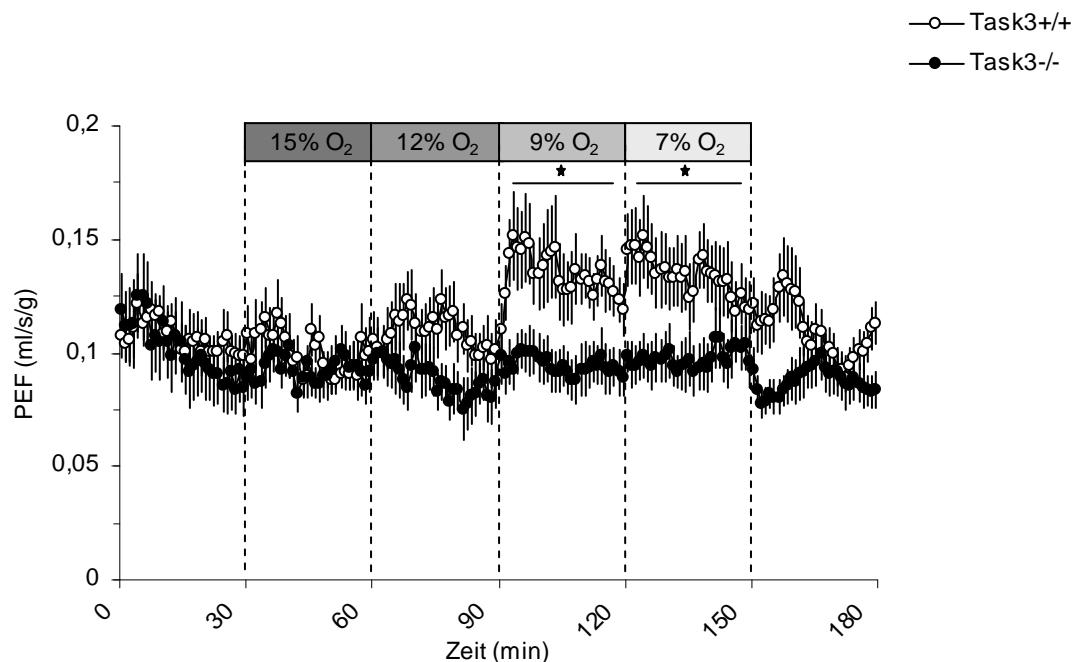


Abb. 23: Verändertes Atemmuster unter höhergradiger Hypoxie – PEF
Ab 9-%iger Sauerstoffzufuhr destabilisierte sich die Respiration der Männchen signifikant.

4.2.3.2 Stufenhypoxie – Weibchen

Geschlechtsabhängig zeigen sich unterschiedliche Formen hypoxischen Atemmusters. Dass TASK3, wenn auch in einer zunächst subtilen Art und Weise, für das Zustandekommen eines physiologischen Ablaufs der Respiration mitverantwortlich ist, zeigt sich auch hier: Weibchen ohne entsprechenden Kaliumkanal ($n=13$) inspirieren im Vergleich zur $TASK3^{+/+}$ Gruppe ($n=15$) bereits bei 15 % O_2 verkürzt (siehe Abb. 24). Darüber hinaus ist das Verhalten der transgenen Mäuse stets durch eine geringere Streuung gekennzeichnet.

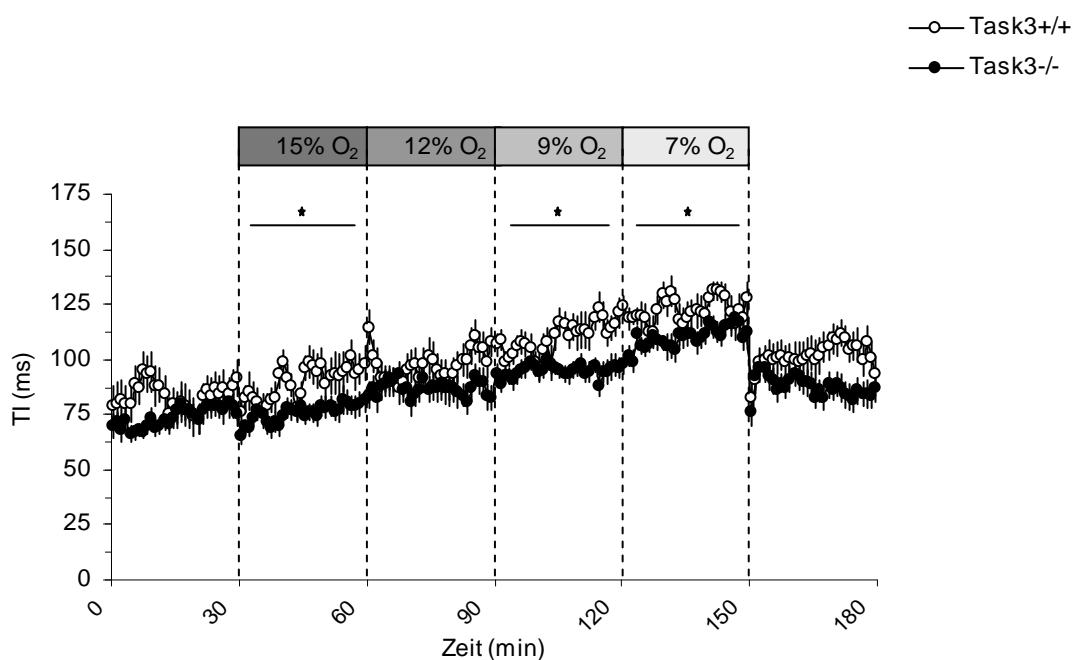


Abb. 24: Inspirationszeit weiblicher Probanden

Deutlicher, weil großteils konsequent für alle Hypoxiephasen, als bei der gegengeschlechtlichen Entsprechung wird hier eine Änderung des Musters der Atmung evident.

4.2.4 Langzeithypoxie

Sobald durch physiologische Vorgänge renaler Mehrausscheidung von basischen Äquivalenten die mit Sauerstoffmangelatmung einhergehende hyperventilationsbedingte Alkalose kompensiert worden ist, kann ein hypoxischer Atemantrieb endlich wieder zur Geltung kommen.

Nachdem in den bisherigen Sauerstoffmangelversuchen dieses Phänomen physiologischer Atemdepression mit vorangehender deutlicher Zunahme der Respiration entsprechend der Vergleichsgruppe bei den gendefizienten Mäusen bestätigt werden konnte, stellte man sich nun die Frage, ob eine fehlende TASK3-Expression den weiteren natürlichen Anpassungsmechanismus an chronische Hypoxie in Form eines kompensatorischen, erneut über Kontrollwerte ansteigenden Minutenvolumens beeinträchtigt.

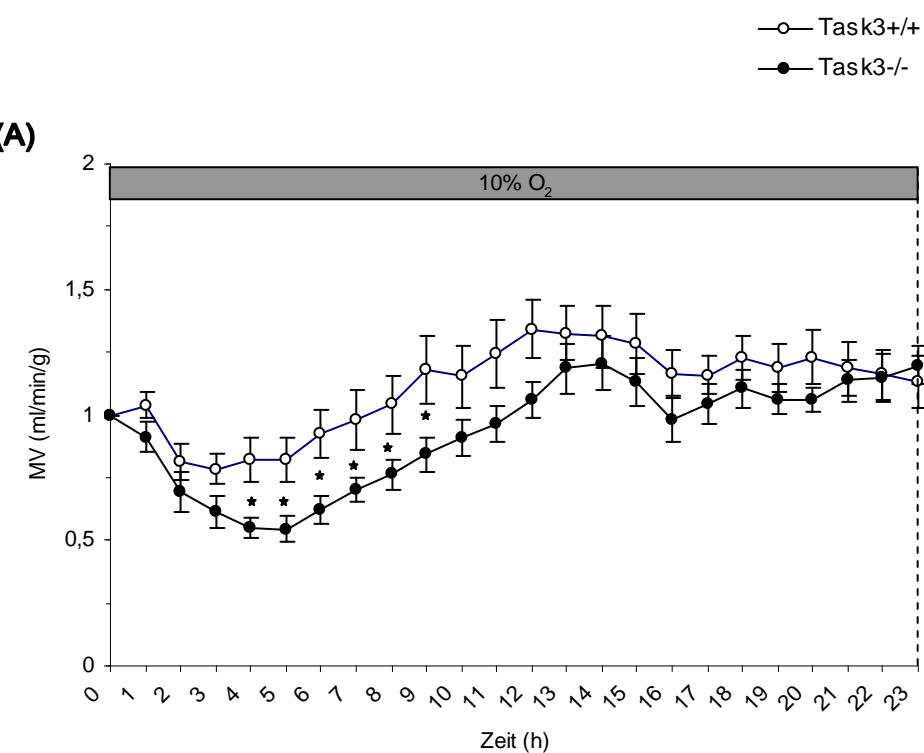
Signifikant verminderte Atmung zu Beginn mit anschließend vollständiger Kompensation. Zum Zwecke eines möglichst großen Stichprobenumfangs lässt sich, nach Ausschluss eines nennenswerten geschlechtsbedingten Unterschieds, das Verhalten aller Versuchstiere (jeweils $n=12$), in seiner Ausprägung ganz unmittelbar nachvollziehen, indem man die Langzeitverlaufswerte auf den jeweiligen Ausgangswert normalisiert.

So ist die akute Mehratmung (Abb. 25: (A)) bei den Knockout-Tieren im Vergleich zu den Wildtypkontrolltieren nur abgeschwächt möglich. Während dann die $TASK3^{+/+}$ Mäuse bereits nach etwa 3 h minimal ventilieren, tun dies die Knockouts erst nach 5 h, dann aber fast um die Hälfte reduziert und zu einem Zeitpunkt, an dem bei der Vergleichsgruppe bereits Erholung eingesetzt hat und deshalb die Atmung nennenswert differiert. Diese signifikante Dissoziation hält noch an, wenn die $TASK3$ -Genträger schon nach 8 Stunden ihre Ruheventilation überschreiten und eine Phase der reaktiven Kompensation der Sauerstoffschuld einleiten, die nach 12 Stunden Hypoxie etwa ein Maximum erreicht. Mäuse, denen der entsprechende Kaliumkanal fehlt, verschieben ihre Atemdynamik hin zu einer steileren Kinetik: erst nach 12 h an der Schwelle zur Erholung - es erfolgt eine allmähliche Annäherung an das Wildtypniveau - , erfolgt diese bereits zwei Stunden später mit der höchsten für die ausgeknockten Tiere möglichen Effektivität, nur knapp zwei Drittel der Vergleichsgruppe.

Da sich das Endergebnis Minutenvolumen unmittelbar über ein Produkt aus Tidalvolumen und Frequenz definiert, ist es sinnvoll, zunächst diese Faktoren mit denkbaren Auswirkungen zu betrachten. So bewegen sich zwar beide Parameter tendenziell zu niedrigeren Werten, tatsächlich bedeutsam und auschlaggebend für eine deutliche Minderatmung der Mutanten ist aber offensichtlich eine seltener als etwa flachere

Atmung (sieh Abb. 25 (B)). Auch hierbei tritt die maximale Frequenzverlangsamung bei den $\text{TASK3}^{+/+}$ nach nur 3-stündigem Sauerstoffmangel schneller ein als bei den gendefekten Tieren, die nach 4 Stunden sogar nur noch rund halb so häufig atmen als unter Kontrollbedingungen.

Dass dieser signifikante Frequenzabfall am ehesten erneut Ausdruck eines TASK3 -Mangel-Atemmusters ist, veranschaulicht Abb. 25 (C): Der maximale exspiratorische Spitzenfluss sinkt dabei $\text{TASK3}^{-/-}$ -abhängig weiter ab als die Referenzwerte und differiert nach 9-stündiger O_2 -Restriktion maximal.



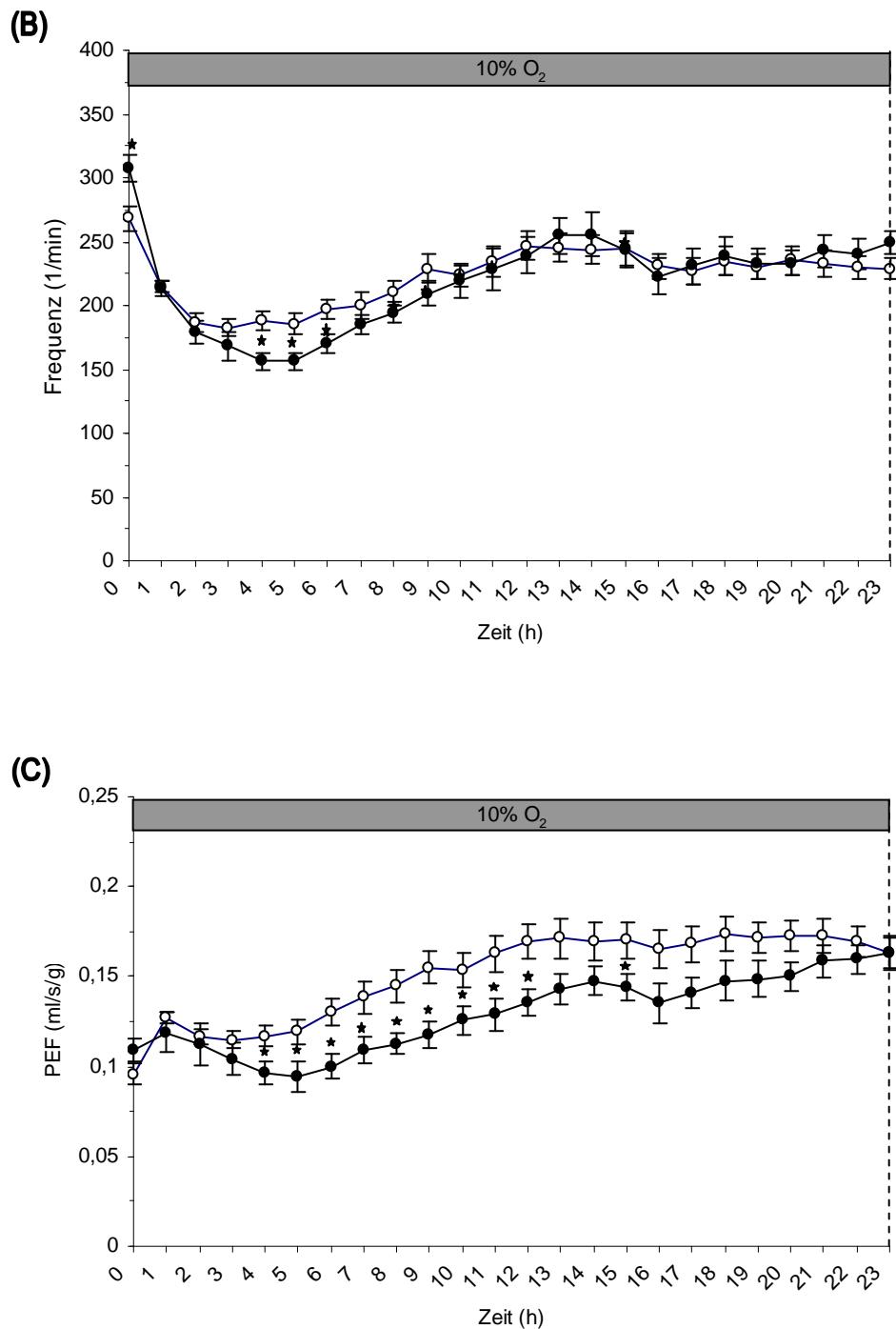


Abb. 25: Verstärkte Depression der Atmung bei Langzeithypoxie (männliche und weibliche Tiere gepoolt) – MV, Frequenz, PEF

(A-B) Veranschaulicht an den normalisierten Werten des Minutenvolumens bedingte der TASK3-Knockout, hauptsächlich getragen durch einen zugeordneten Frequenzabfall, eine im Vergleich zur Wildtypkontrolle signifikant stärkere Depression. (C) Genotypabhängig verlangsamte sich die Exspiration der Knockout-Versuchstiere unter geschlechtsunspezifischer Betrachtung deutlich (jeweils $n=12$).

Signifikante Verlängerung der Exspirationszeit bei den Weibchen. Obiger Hinweis auf stattgehabte Veränderungen des Respirationsmusters als Knockout-Effekt wird am deutlichsten in geschlechtsspezifischer Betrachtung verifiziert (gemäß Abb.26). Während die steile TE-Kurve der weiblichen TASK3^{-/-}-Mäuse (Abb. 26, n=4) einem maximalen Scheitelpunkt der gut 2,5-fachen Ausatmungszeit zustrebt, erreicht der gleichsam gekappte Vergleichsgipfel (auch n=4) lediglich rund 170 % seines Kontrollwertes. So ergibt sich für diese Depressionsphase der hypoxischen Adaptation insgesamt ein hohes Signifikanzniveau.

Die beobachtete erhöhte Reagibilität, auch mit konsekutiver überschießender Gegenregulation, spricht zusammen mit den überwiegend höheren Standardabweichungen der TASK3^{-/-}-Weibchen für einen destabilisierenden Effekt des Genmangels.

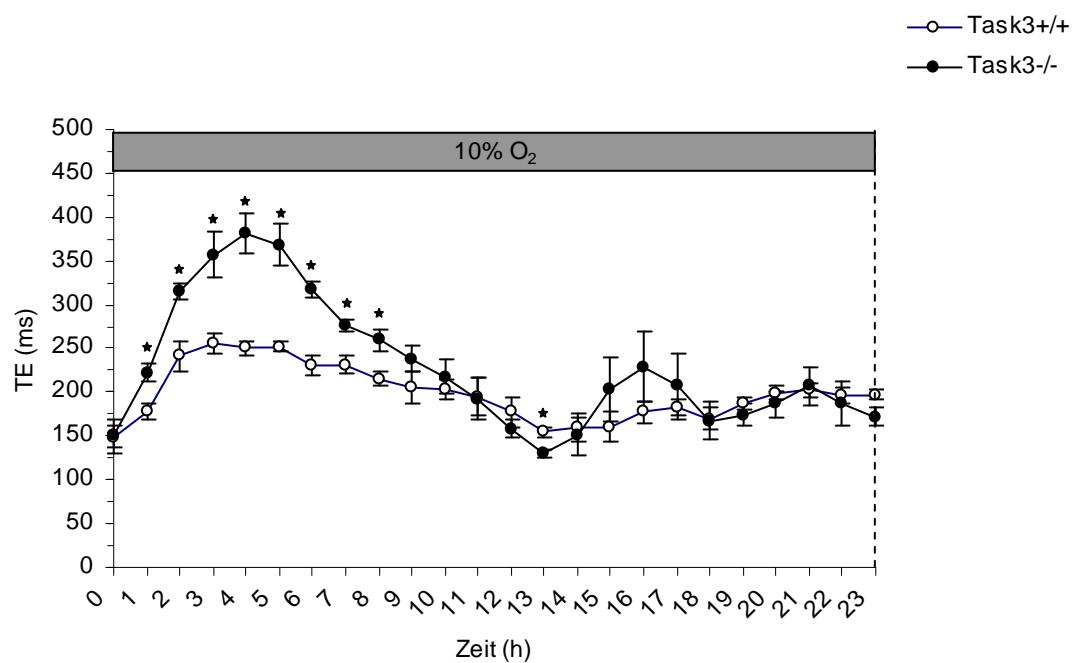


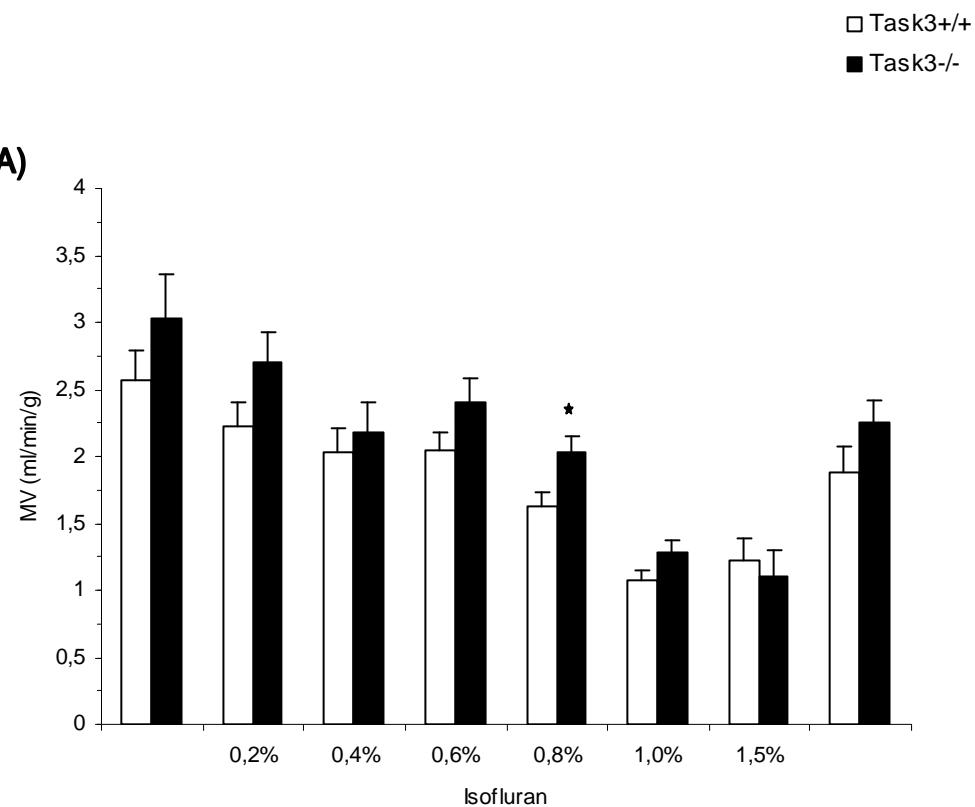
Abb. 26: Exspirationszeit unter mehrstündiger Hypoxie

Besonders die TASK3-defizienten Weibchen atmeten während der Depressionsphase geschlechtsspezifisch deutlich verlängert aus (je n=4).

4.2.5 Isofluran

Von besonderer klinischer Relevanz ist der *in vitro* nachgewiesene, direkt aktivierende Einfluss von volatilen Anästhetika auf TASK3, dessen phänotypisch möglicherweise atemdepressiver Effekt durch diese *in vivo* Versuchsreihe nach bereits obig erklärtem Protokoll eruiert werden sollte.

Nur geringe Unterschiede zwischen den Genotypen. Genotypunabhängig reagierten alle Mäuse in ähnlicher Weise auf steigende Konzentrationen von Isofluran im inspiratorische Gasgemisch: In den Abbildungen 27 und 28 sind die Daten von männlichen Tieren (TASK3^{-/-} n=4, TASK3^{+/+} n=7) und weiblichen Tieren (TASK3^{-/-} n=8, TASK3^{+/+} n=7) zusammengefasst, da keine Geschlechtsunterschiede festgestellt wurden. Interessant ist hierbei, dass bei den Wildtyp-Mäusen die Suppression der Atmung bereits bei etwas niedrigeren Konzentrationen von Isofluran eintrat. Erst bei höheren Konzentrationen von 1 und 1,5 % war die Atmung bei Knockouttieren gleich oder sogar geringgradig stärker supprimiert.



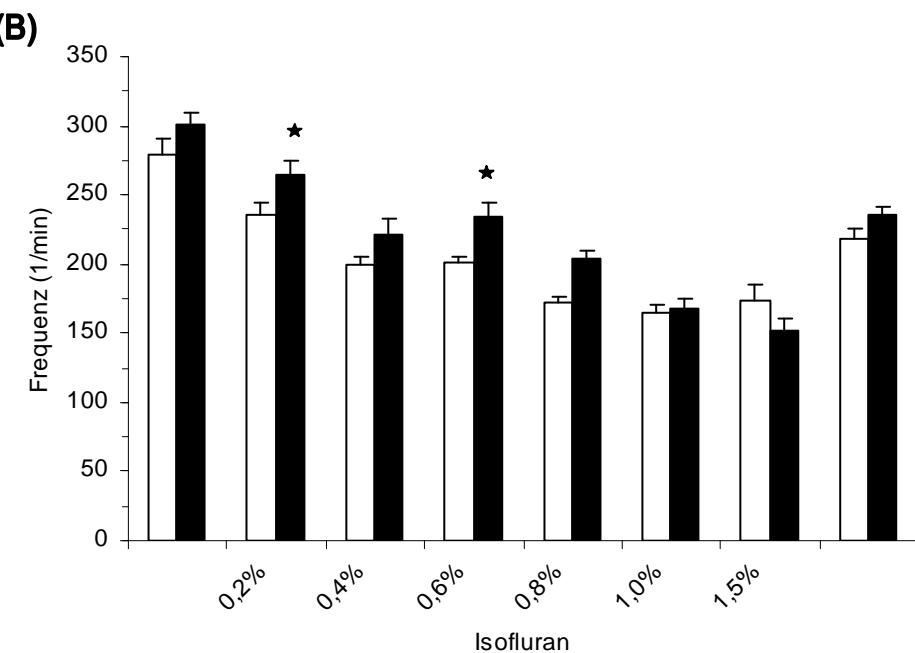
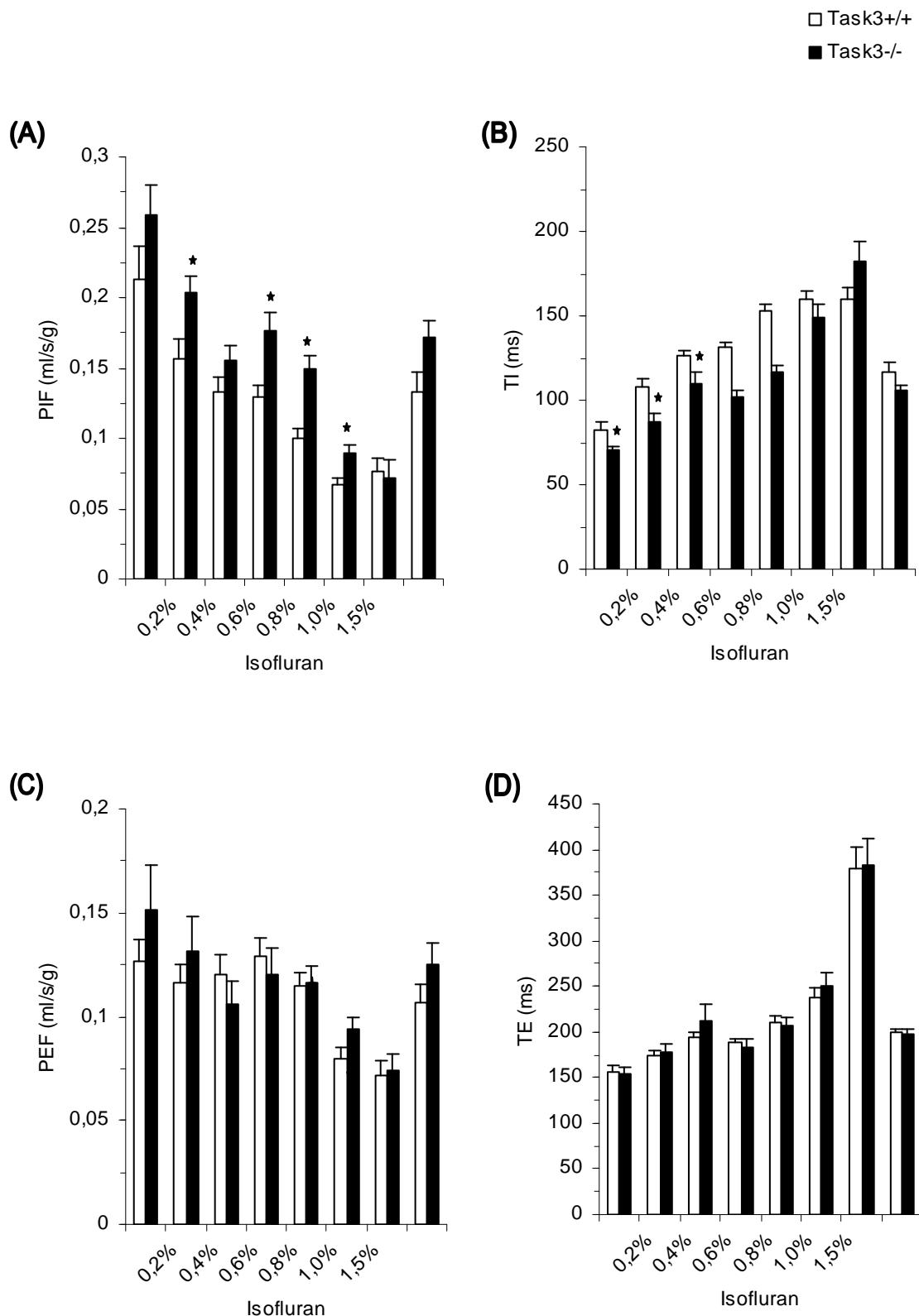


Abb. 27: Einfluss von volatilen Anästhetika auf die Atmung

(A) Genotypunabhängig supprimierte Isoflurane, je nach Konzentration, die Respiration quantitativ in ähnlicher Weise bei Wildtyp- und Knockout-Mäusen. (B) Ähnlich dem Minutenvolumen starten die Knockouts von einem schnelleren Ausgangsniveau, zeigen aber unter 1,5 % eine stärkere Depression (TASK^{+/+} n=14, TASK^{-/-} n=12).

Untersuchung des Atemmusters unter Isoflurane. Um die geringen genotypabhängigen Unterschiede weiter aufzuschlüsseln, sind in Abbildung 28 die Atemparameter PIF, TI, PEF und TE dargestellt. Interessanterweise ist es vor allem die Einatmungsphase, die durch den TASK3-Knockout beeinflusst wurde: Die Einatemzeit TI ist verkürzt und der maximale inspiratorische Atemfluss ist deutlich verstärkt. Erst bei hohen Konzentrationen von Isoflurane, die bereits für wenig schmerzhafte operative Eingriffe ausreichend (1 und 1,5 %) ist, verschwindet der genotypabhängige Unterschied, bzw. er dreht sich sogar tendentiell um.

**Abb. 28: Atmungsmuster unter Isoflurane**

(A-D) Sowohl unter isolierter Betrachtung von weiblichen und männlichen Versuchstieren, wie auch hier im gesamten Kollektiv (TASK3^{-/-} n=12, TASK3^{+/+} n=14) ließ sich eine Tendenz hin zu einer veränderten Struktur der Respiration erkennen.

5. Diskussion

Mittels Real-time-PCR konnten bereits durchgeführte Expressionsstudien (1;4;12;30) von TASK3 in murinem Gewebe bestätigt werden: TASK3 kommt insbesondere in adrenalalen und von der Neuralleiste abstammenden Zellen sowie deren Abkömmlingen, wie sie allen voran in den konstant vorkommenden Glomera carotica zu finden sind, vor. Im Hirnstamm wurde der pH-regulierte TASK3 in respiratorischen Neuronengruppen gefunden (1;4;12;31) und ist auch in den Glomusorganen, den peripheren Chemorezeptoren, exprimiert (33). In der Nebennierenrinde ist TASK3 besonders stark in den Aldosteronproduzierenden Glomerulosazellen exprimiert und bestimmt deren Membranpotential (3). Zusätzlich zu seiner Lokalisation prädestinieren auch die elektrophysiologischen Eigenschaften und die Regulation durch pH und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren für eine Rolle von TASK3 bei der Kreislauf- und Atemregulation.

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich anhand der TASK3-Knockoutmaus daher besonders die Auswirkungen der Inaktivierung von TASK3 auf die Regulation der Atmung durch CO_2 und Hypoxie sowie auf die Wirksamkeit des volatilen Anästhetikums Isofluran hin untersucht.

5.1 TASK3 in der Nebennierenrinde

Zunächst habe ich mittels Realtime-PCR die Expression von TASK3 in verschiedenen Geweben der Maus studiert. Die Daten bestätigten die bereits bekannte starke Expression von TASK3 in der Nebenniere. Dort kommt TASK3 sowohl im Mark als auch in der Rinde vor. Daten aus unserer Gruppe (welche nicht Gegenstand meiner Arbeit waren) und Arbeiten von Bayliss und Barrett (14) an der TASK1/TASK3-Doppelknockoutmaus sprechen für eine zentrale Rolle von TASK3 für die Kontrolle des Membranpotentials der Glomerulosazellen. Über die Kontrolle des Membranpotentials beeinflussen TASK-Kanäle spannungsregulierte Ca^{2+} -Kanäle und darüber die Aldosteronproduktion.

5.2 TASK3 in Geweben neuroepithelialen Ursprungs

Ebenfalls hervorstechend und in Einklang mit bereits publizierten Ergebnissen war im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Signal von TASK3 im ZNS (1;4;12;31;68): Eine bereits erfolgte genauere Zuordnung zu denjenigen Neuronengruppen im Hirnstamm, die dem Atemzentrum oder seinen Kontrollinstanzen zugeschrieben werden, sprach für eine Beteiligung von TASK3 an der Regulation der Respiration. Dazu passend sind auch die

Charakteristiken dieses Kaliumstromes, insbesondere seine Chemosensibilität, wie sie an anderer Stelle in zahlreichen *in vitro*-Versuchen nachgewiesen wurde. Dass diese Reagibilität auf Veränderungen des chemischen Milieus auch für einen in den neuroektodermalen Zellen der Karotiskörperchen vorkommenden Kaliumstrom bestätigt werden konnte (33), macht für TASK3 eine Rolle bei der Chemorezeption und Kontrolle der Atmung sowohl auf zentraler, als auch auf peripherer Ebene wahrscheinlich.

Darüber hinaus wurde der weiten Verbreitung von TASK3 im ZNS eine neuroprotektive Funktion, insbesondere unter Narkose, zugesprochen - zu den vermuteten zugrundeliegenden Mechanismen wird verwiesen auf Patel&Honore (50), Liu, Cotten, et al. (42) und Ehling, Bittner, et al. (19).

Eine andere Arbeitsgruppe beobachtete an TASK3-Knockout-Tieren eine vermehrte Nachtaktivität und brachte diese in Verbindung mit einer fehlerhaften Kaskade zur Hemmung von hypothalamischen orexinhaltigen Neuronen (41). Mit der starken Lokalisation von TASK3 im Hippocampus wurden kognitive Defizite der TASK^{-/-}-Mäuse erklärt (41).

Die breite Expression von TASK3 im ZNS spricht dafür, dass dieser Kanal eine Reihe von Funktionen in verschiedenen Bereichen des Gehirns wahrnimmt. Diese Funktionen sind allerdings bisher nur unzureichend untersucht und unser Verständnis darüber ist noch sehr lückenhaft (41).

5.3 Einfluss von TASK3 auf die Atmungsregulation *in vivo*

Das Modell der TASK3-Knockout-Maus hat es nun möglich gemacht die Bedeutung dieses Kaliumstromes, der durch seine bereits erklärten Eigenschaften besonders dafür prädestiniert erscheint, an der Kontrolle der Respiration beteiligt zu sein, quasi *ex negativo* zu untersuchen. Dafür wurden die plethysmographischen Versuchsreihen mit gerade denjenigen Stimuli durchgeführt, für die *in vitro* eine Reaktionsfähigkeit von TASK3 nachgewiesen worden ist und die auch in der klinischen Praxis in einem engeren Zusammenhang mit diesem wichtigen Vitalparameter stehen: Hyperkapnie, Hypoxie unterschiedlicher Ausprägung und, als Vertreter aus der Gruppe der volatilen Anästhetika, Isofluran.

Dabei war der Einfluss der TASK3-Defizienz keinesfalls ein kompromissloser, im Sinne einer in Gänze unberührten Chemorezeption oder ihres vollständigen Ausfalles, der zentrale Atemparameter Minutenvolumen als Produkt aus Tidalvolumen und Frequenz verhielt sich weitgehend genotyp- und auch geschlechtsunabhängig. Dass das untersuchte Kanalprotein aber zumindest beteiligt ist am Zustandekommen effektiver

Respiration zeigen sporadische, dann teilweise auch geschlechtsbedingte Veränderungen des Atemmusters im Sinne qualitativer Beeinflussung.

5.3.1 Trotz TASK3^{-/-} erhaltener Atemstimulus unter Hyperkapnie

Als stärkster Atemantrieb überhaupt wirkt eine erhöhte CO₂-Fraktion in der Inspirationsluft direkt auf zentrale Chemorezeptoren an der ventralen Oberfläche der Medulla oblongata. Wie eingangs erwähnt werden hier insbesondere aufgrund ihrer Möglichkeit, auf ein verändertes chemisches Milieu schnell zu reagieren bestimmte K2P-Kanäle, und hier vor allem TASKs, in Betracht gezogen (37).

Dass nun TASK3 nicht essentiell ist für die kohlendioxidbedingte Mehratmung, zeigen die Messergebnisse im Rahmen dieser Abhandlung, die unter erhöhter Kohlendioxidzufuhr in ihrer Quantität weder signifikant TASK3-, noch geschlechtsabhängig sind: Sowohl männliche, als auch weibliche Versuchstiere steigern ihr Minutenvolumen bei 5- resp. 10-%iger Kohlendioxidkonzentration in der Einatmungsluft in nahezu identischer Weise wie die jeweiligen Wildtypen, und zwar vorzugsweise über eine Vergrößerung des Tidalvolumens.

Das veränderte Atemmuster jedoch, belegt durch eine gegenüber Wildtypieren veränderte Ein- und Ausatmungszeit unter Hyperkapnie deutet auf eine wenn auch begrenzte Beteiligung dieses Kaliumkanals an der Wirkung von CO₂ auf die hyperkapnische Ventilationssteigerung hin.

5.3.2 Kein kritischer Einfluss der TASK3-Defizienz bei akuter Hypoxie

Die physiologische Anpassung an einen reduzierten Sauerstoffgehalt der Einatmungsluft erfolgt hauptsächlich über die periphere Chemorezeption. Dabei laviert der Organismus zwischen der initialen hypoxischen Mehratmung und einer folgenden Phase der hypoxisch-hypokapnischen Atemdepression.

Dieser physiologische Verlauf des zentralen Parameters Minutenvolumen bleibt in dieser Versuchsreihe sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Knockout-Tieren erhalten, was darauf hindeutet, dass auch im Fokus peripherer Chemosensibilität, deren Hauptanteil in die Glomera carotica lokalisiert ist (33), TASK3 als sauerstoffempfindliches Kanalprotein ersetzbar ist. Wie schon für das zentrale Kompartiment werden hierfür viele plausible Mechanismen angenommen. Die Mannigfaltigkeit dieser Kompensationsmechanismen wird auch hier durch ein verändertes Respirationsmuster bei fehlendem KCNK9 angedeutet.

5.3.3 Quantitativ kein Unterschied unter stufenweiser O₂-Absenkung

Auch während allmählicher Reduktion der Sauerstoffkonzentration bis zu einem minimalem Wert von 7 % inspiratorischer O₂-Fraktion verlaufen die Atemminutenvolumenkurven der beiden Versuchsgruppen - bis auf eine nur bei den männlichen Knockouts zu beobachtenden attenuierten Erholungsphase - parallel. Diese andere Kinetik macht hier möglicherweise einen androgenabhängigen Einfluss der TASK3-Defizienz wahrscheinlich (38).

Zudem zeigt sich eine geschlechtspezifisch unterschiedlich geartete Veränderung des Atemmusters: Die männlichen gendefizienten Mäuse atmen mit zunehmendem O₂-Mangel, ab 9 % O₂ signifikant weniger forciert, in der Nachkontrollphase wohl auf Kosten verminderter Adaptationsreserven. Weibchen ohne KCNK9 verkürzen nahezu konsistent für alle Stufen des Sauerstoffmangels ihre Inspiration.

Insgesamt zeigen diese Befunde erneut eine zwar nicht lebensnotwendig essentielle, kompensierbare Funktion von TASK3 bei den zahlreichen Mechanismen der Atmungsregulation, dessen Verlust jedoch auch nicht spurlos vorübergeht.

5.3.4 Langzeithypoxie: Ohne TASK3 stärkere hypoxische Depression

Unter anhaltender Sauerstoffrestriktion (10 % FiO₂) zeigten Knockout-Tiere eine stärker ausgeprägte hypoxische Depression der Atmung. Dieser Effekt war bei beiden Geschlechtern zu beobachten. In diesem Zusammenhang war besonders der maximale Atemfluss bei der Expiration (PEF) der Mutanten gegenüber dem der Wildtypen reduziert. Der Mechanismus, über welchen die verstärkte hypoxische Depression zustande kommt, ist allerdings gegenwärtig noch unklar.

5.3.5 Leichtgradig verminderte Isofluran-induzierte Atemdepression

Die Aktivierung von TASK3 durch volatile Anästhetika *in vitro* ließ vermuten, dass dieser Kanal an der atemdepressorischen Wirkung von Inhalationsnarkotika beteiligt sein könnte (4;45): Bei einer Beteiligung von TASK3 an der Anästhetika-induzierten Atemdepression wäre zu erwarten, dass TASK3-Knockoutmäuse, bei denen eine TASK3-Aktivierung durch Isofluran nicht mehr die neuronale Aktivität dämpfen kann, resistenter gegenüber der atemsupprimierenden Wirkung von solchen Anästhetika sind. Tatsächlich beobachtete ich bei niedrigen Isoflurankonzentrationen eine etwas weniger ausgeprägte Hemmung der Atmung bei männlichen und weiblichen Knockoutmäusen. Erst bei höheren Isoflurankonzentration von 1 und 1,5 % war dieser genotypabhängige Unterschied aufgehoben. Dabei war vor allem die Einatmung der Knockout-Tiere schneller und

kraftvoller. Diese Daten sprechen dafür, dass bei niedrigen Anästhetikakonzentrationen eine TASK3-Aktivierung tatsächlich zu den Faktoren zählt, die die Atmung von Wildtypieren supprimieren. Bei höheren Konzentrationen hingegen scheinen andere Mechanismen, z.B. die Aktivierung von TASK1 oder TREK1-Kanälen, maßgeblich für die Atemdepression zu sein.

5.3.6 Klinische Bedeutung des TASK3-Mangels

Sofern Versuchsergebnisse an Mäusen auf den menschlichen Organismus extrapoliert werden dürfen, entsprechen die Resultate bezüglich des Vitalparameters ‚Atmung‘, der im Zentrum dieser Abhandlung steht, an anderer Stelle gemachten Beobachtungen (41): Auf dem ersten Blick macht im klinisch-praktischen Alltag eine TASK3-Defizienz vermutlich einen ganz ‚normalen‘ Eindruck, der Phänotyp gleicht wahrscheinlich dem eines Gesunden, was dafür spricht, dass sein Fehlen wohl sehr gut kompensiert werden kann (41). Der für den Atemantrieb so lebenswichtige Vorgang der Chemorezeption bleibt weitestgehend erhalten, lediglich die detaillierte Analyse zeigt kleinere Veränderungen, die auf eine modifizierte Atmungsregulation schließen lassen.

Volatile Anästhetika sind im klinischen Alltag sehr wichtig und nicht wegzudenkende Bestandteile der modernen Narkosetechnik. Ihnen ist gemein, dass sie offensichtlich eine dämpfende Wirkung auf respiratorische Neurone im unteren Hirnstamm haben. Volatile Substanzen, wie Halothan, Isofluran und Sevofluran, und intravenöse Barbiturate (Phentobarbital, Thiopental) beeinträchtigen recht unselektiv Ein- und Ausatmung indem sie synaptische Interaktionen beeinflussen. Dissoziative Narkotika (Ketamin, Phencyclidin, Dizocilpin) wirken hingegen spezifischer über eine Blockade von NMDA-Rezeptoren und alterieren so die Inspiration (24). Zudem kommt es durch diese Narkosemittel zu einer Desensibilisierung von Chemorezeptoren (24), seine bereits dargestellte Pharmakologie macht TASK3 hierbei zu einem potentiellen Vermittler. TASK3^{-/-}-Tiere zeigten eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber volatilen Anästhetika (41), wie es auch im Rahmen dieser Arbeit am lebenden Tier nachgewiesen werden konnte.

Umgekehrt können diesselben Rezeptoren genauso wie die neuromuskuläre Übertragung Angriffspunkte von Atemstimulanzien sein (klinisch u. U. wichtig für pathologische Zustände wie den plötzlichen Kindstod) (24).

Inwieweit das Fehlen von TASK3 für die Entstehung von sehr komplexen, die Atmung affektierenden krankhaften Zuständen, wie beispielsweise dem Schlafapnoesyndrom, der periodischen Atmung oder dem plötzlichen Kindstod (mit-) verantwortlich gemacht werden kann, kann zum jetzigen Zeitpunkt nur gemutmaßt werden, stellt aber eine interessante und in die Zukunft weisende Fragestellung dar.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Lokalisation des **TWIK-related Acid-Sensitive K⁺ channel 3**, eines Vertreters der 2-Poren-Domänen-Kanäle, im Organismus untersucht.

Basierend darauf wurden Überlegungen zu möglichen Funktionen dieses Proteins angestellt. Aufgrund der Genexpression war vermutet worden, dass der Kanal eine Rolle bei der Chemosensibilität und damit bei der Kontrolle der Atmung spielt. Mithilfe eines Knockouttiermodells habe ich daher den Einfluss von TASK3 auf die Atmungsregulation in der Ganzkörperplethysmographie untersucht.

Starke TASK3-Expression in der Nebenniere und im ZNS. In Real-time-PCR-Experimenten fand sich eine besonders starke Expression in zwei der untersuchten Gewebe, in der Nebenniere und im ZNS. Unsere Arbeitsgruppe hat zwischenzeitlich Hinweise darauf, dass TASK3 in Verbindung mit TASK1 eine wichtige Rolle bei der Sekretion von Aldosteron und bei der Pathophysiologie des primären Hyperaldosteronismus spielt (3). Bei meinen Versuchen war TASK3 im ZNS besonders im Kleinhirn und Hirnstamm exprimiert. Dies ist im Einklang mit Befunden anderer Arbeitsgruppen, welche TASK3 in chemorezeptiven Zellen des Hirnstamms und des Glomus caroticum fanden. Eine mögliche Rolle von TASK3 bei der Atmungsregulation wird jedoch kontrovers diskutiert (1;4;12;31;33;47;68).

Keine essentielle Funktion in der Atmungsregulation. Basierend auf vorhandenen *in vitro*-Ergebnissen zur Hemmbarkeit von TASK3 durch extrazelluläre Ansäuerung und zur Aktivierung des Kaliumstromes durch Inhalationsnarkotika, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die Atmungsregulation durch CO₂ und Hypoxie sowie durch die Wirkung von Isofluran bei TASK3-Knockoutmäusen verändert ist. Interessanterweise konnte bei den plethysmographischen Versuchsprotokollen durchweg kein kritischer Einfluss einer TASK3-Defizienz auf die Atmung ausgemacht werden.

Unter Hyperkapnie blieb dabei der Atemantrieb trotz inaktiviertem TASK3-Kanal bei beiden Geschlechtern erhalten. Auch die Empfindlichkeit auf akute Hypoxie war weitgehend unverändert. Es fiel jedoch auf, dass bei schrittweiser Reduktion des Sauerstoffs im inspiratorischen Gasgemisch männliche TASK3-Knockoutmäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe eine attenuierte Atemantwort zeigten. Bei Langzeithypoxie über viele Stunden war bei männlichen und weiblichen TASK3-Knockoutmäusen die hypoxische Depression der Atmung verstärkt. Unter niedrigen Isoflurankonzentrationen war die Atemsuppression bei Knockouttieren leicht vermindert. Dies spricht dafür, dass

Isofluran bei Wildtyptieren unter anderem über eine Aktivierung von TASK3 die Atmung unterdrückt.

Fazit. Unter TASK3-Defizienz bleibt die Chemorezeption im Dienste des lebensnotwendigen Gasaustausches weitgehend unverändert erhalten. Genauere Analysen der plethysmographischen Daten deuten jedoch darauf hin, dass es unter Hypoxie bei Knockouttieren zu einer leichten Beeinträchtigung der Atmungsregulation kommt. Auch ist die Empfindlichkeit für niedrige Isoflurankonzentrationen bei Knockouttieren vermindert. Auch wenn Studien anderer Arbeitsgruppen eine wichtige Rolle von TASK3 auf der Ebene der einzelnen Zelle zeigen, so deuten die hier vorgestellten *in vivo* Analysen auf umfangreiche Kompensationsmechanismen und Plastizität der an der Atmungsregulation beteiligten Neuronengruppen hin.

7. Literaturverzeichnis

1. Aller, M. I. and W. Wisden. Changes in expression of some two-pore domain potassium channel genes (KCNK) in selected brain regions of developing mice. *Neuroscience* 151: 1154-1172, 2008.
2. Ashmole, I., D. V. Vavoulis, P. J. Stansfeld, P. R. Mehta, J. F. Feng, M. J. Sutcliffe, and P. R. Stanfield. The response of the tandem pore potassium channel TASK-3 (K(2P)9.1) to voltage: gating at the cytoplasmic mouth. *J.Physiol* 587: 4769-4783, 2009.
3. Bandulik, S., D. Penton, J. Barhanin, and R. Warth. TASK1 and TASK3 potassium channels: determinants of aldosterone secretion and adrenocortical zonation. *Horm.Metab Res.* 42: 450-457, 2010.
4. Bayliss, D. A., J. E. Sirois, and E. M. Talley. The TASK family: two-pore domain background K⁺ channels. *Mol.Interv.* 3: 205-219, 2003.
5. Beck, J. S., S. Breton, R. Laprade, and G. Giebisch. Volume regulation and intracellular calcium in the rabbit proximal convoluted tubule. *Am.J.Physiol* 260: F861-F867, 1991.
6. Berg, A. P., E. M. Talley, J. P. Manger, and D. A. Bayliss. Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K⁺ (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits. *J.Neurosci.* 24: 6693-6702, 2004.
7. Biancardi, V., K. C. Bicego, M. C. Almeida, and L. H. Gargaglioni. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. *Pflugers Arch.* 455: 1119-1128, 2008.
8. Buckler, K. J. and R. D. Vaughan-Jones. Role of intracellular pH and [Ca²⁺]_i in acid chemoreception in type-I cells of the carotid body. *Adv.Exp.Med.Biol.* 360: 41-55, 1994.
9. Burg, E. D., C. V. Remillard, and J. X. Yuan. K⁺ channels in apoptosis. *J.Membr.Biol.* 209: 3-20, 2006.
10. Burki, N. K. Clinical investigation of abnormalities of ventilatory regulation. *South.Med.J.* 76: 766-772, 1983.
11. Chapman-Smith, A., J. K. Lutwyche, and M. L. Whitelaw. Contribution of the Per/Arnt/Sim (PAS) domains to DNA binding by the basic helix-loop-helix PAS transcriptional regulators. *J.Biol.Chem.* 279: 5353-5362, 2004.
12. Chapman, C. G., H. J. Meadows, R. J. Godden, D. A. Campbell, M. Duckworth, R. E. Kelsell, P. R. Murdock, A. D. Randall, G. I. Rennie, and I. S. Gloger. Cloning, localisation and functional expression of a novel human, cerebellum specific, two pore domain potassium channel. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 82: 74-83, 2000.

13. Clarke, C. E., E. L. Veale, K. Wyse, J. I. Vandenberg, and A. Mathie. The M1P1 loop of TASK3 K2P channels apposes the selectivity filter and influences channel function. *J.Biol.Chem.* 283: 16985-16992, 2008.
14. Davies, L. A., C. Hu, N. A. Guagliardo, N. Sen, X. Chen, E. M. Talley, R. M. Carey, D. A. Bayliss, and P. Q. Barrett. TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105: 2203-2208, 2008.
15. Donnelly, D. F. K⁺ currents of glomus cells and chemosensory functions of carotid body. *Respir.Physiol* 115: 151-160, 1999.
16. Duffin, J. The chemoreflex control of breathing and its measurement. *Can.J.Anaesth.* 37: 933-942, 1990.
17. Duffin, J., R. M. Mohan, P. Vasiliou, R. Stephenson, and S. Mahamed. A model of the chemoreflex control of breathing in humans: model parameters measurement. *Respir.Physiol* 120: 13-26, 2000.
18. Duprat, F., F. Lesage, M. Fink, R. Reyes, C. Heurteaux, and M. Lazdunski. TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.* 16: 5464-5471, 1997.
19. Ehling, P., S. Bittner, N. Bobak, T. Schwarz, H. Wiendl, T. Budde, C. Kleinschnitz, and S. G. Meuth. Two pore domain potassium channels in cerebral ischemia: a focus on K2P9.1 (TASK3, KCNK9). *Exp.Transl.Stroke Med.* 2: 14, 2010.
20. Flanagan, S. E., S. Clauin, C. Bellanne-Chantelot, P. de Lonlay, L. W. Harries, A. L. Gloyn, and S. Ellard. Update of mutations in the genes encoding the pancreatic beta-cell K(ATP) channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and sulfonylurea receptor 1 (ABCC8) in diabetes mellitus and hyperinsulinism. *Hum.Mutat.* 2008.
21. Funk, G. D. and J. L. Feldman. Generation of respiratory rhythm and pattern in mammals: insights from developmental studies. *Curr.Opin.Neurobiol.* 5: 778-785, 1995.
22. Gargaglioni, L. H., K. C. Bicegoa, and L. G. Branco. Brain monoaminergic neurons and ventilatory control in vertebrates. *Respir.Physiol Neurobiol.* 164: 112-122, 2008.
23. Guyon, A., M. P. Tardy, C. Rovere, J. L. Nahon, J. Barhanin, and F. Lesage. Glucose inhibition persists in hypothalamic neurons lacking tandem-pore K⁺ channels. *J.Neurosci.* 29: 2528-2533, 2009.
24. Haji, A., R. Takeda, and M. Okazaki. Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacol.Ther.* 86: 277-304, 2000.
25. Hebert, S. C., G. Desir, G. Giebisch, and W. Wang. Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev.* 85: 319-371, 2005.

26. Heginbotham, L., Z. Lu, T. Abramson, and R. MacKinnon. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys.J.* 66: 1061-1067, 1994.
27. Heinemann, S., J. Rettig, V. Scott, D. N. Parcej, C. Lorra, J. Dolly, and O. Pongs. The inactivation behaviour of voltage-gated K-channels may be determined by association of alpha- and beta-subunits. *J.Physiol Paris* 88: 173-180, 1994.
28. Hui, E. P., A. T. Chan, F. Pezzella, H. Turley, K. F. To, T. C. Poon, B. Zee, F. Mo, P. M. Teo, D. P. Huang, K. C. Gatter, P. J. Johnson, and A. L. Harris. Coexpression of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha, carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival. *Clin.Cancer Res.* 8: 2595-2604, 2002.
29. Inagaki, N., T. Gonoi, J. P. Clement, C. Z. Wang, L. Aguilar-Bryan, J. Bryan, and S. Seino. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* 16: 1011-1017, 1996.
30. Jan, L. Y. and Y. N. Jan. Tracing the roots of ion channels. *Cell* 69: 715-718, 1992.
31. Karschin, C., E. Wischmeyer, R. Preisig-Muller, S. Rajan, C. Derst, K. H. Grzeschik, J. Daut, and A. Karschin. Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K(+) channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system. *Mol.Cell Neurosci.* 18: 632-648, 2001.
32. Khoo, M. C. Determinants of ventilatory instability and variability. *Respir.Physiol* 122: 167-182, 2000.
33. Kim, D., E. J. Cavanaugh, I. Kim, and J. L. Carroll. Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K⁺ channel in rat carotid body glomus cells. *J.Physiol* 587: 2963-2975, 2009.
34. Kim, Y., H. Bang, and D. Kim. TASK-3, a new member of the tandem pore K(+) channel family. *J.Biol.Chem.* 275: 9340-9347, 2000.
35. Knaus, H. G., K. Folander, M. Garcia-Calvo, M. L. Garcia, G. J. Kaczorowski, M. Smith, and R. Swanson. Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel from smooth muscle. *J.Biol.Chem.* 269: 17274-17278, 1994.
36. Kubin, L. and V. Fenik. Pontine cholinergic mechanisms and their impact on respiratory regulation. *Respir.Physiol Neurobiol.* 143: 235-249, 2004.
37. Lahiri, S. and R. E. Forster. CO₂/H(+) sensing: peripheral and central chemoreception. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 35: 1413-1435, 2003.
38. Lahiri, S., C. Rozanov, A. Roy, B. Storey, and D. G. Buerk. Regulation of oxygen sensing in peripheral arterial chemoreceptors. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 33: 755-774, 2001.

39. Lang, F., M. Foller, K. S. Lang, P. A. Lang, M. Ritter, E. Gulbins, A. Vereninov, and S. M. Huber. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J.Membr.Biol.* 205: 147-157, 2005.
40. Lesage, F. and M. Lazdunski. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 279: F793-F801, 2000.
41. Linden, A. M., C. Sandu, M. I. Aller, O. Y. Vekovischeva, P. H. Rosenberg, W. Wisden, and E. R. Korpi. TASK-3 knockout mice exhibit exaggerated nocturnal activity, impairments in cognitive functions, and reduced sensitivity to inhalation anesthetics. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 323: 924-934, 2007.
42. Liu, C., J. F. Cotten, J. A. Schuyler, C. S. Fahlman, J. D. Au, P. E. Bickler, and C. S. Yost. Protective effects of TASK-3 (KCNK9) and related 2P K channels during cellular stress. *Brain Res.* 1031: 164-173, 2005.
43. Lydic, R. and H. A. Baghdoyan. Cholinoreceptive pontine reticular mechanisms cause state-dependent respiratory changes in the cat. *Neurosci.Lett.* 102: 211-216, 1989.
44. McNamara, B., D. C. Winter, J. E. Cuffe, G. C. O'Sullivan, and B. J. Harvey. Basolateral K⁺ channel involvement in forskolin-activated chloride secretion in human colon. *J.Physiol* 519 Pt 1: 251-260, 1999.
45. Meadows, H. J. and A. D. Randall. Functional characterisation of human TASK-3, an acid-sensitive two-pore domain potassium channel. *Neuropharmacology* 40: 551-559, 2001.
46. Miyamoto, T., M. Inagaki, H. Takaki, T. Kawada, Y. Yanagiya, M. Sugimachi, and K. Sunagawa. Integrated characterization of the human chemoreflex system controlling ventilation, using an equilibrium diagram. *Eur.J.Appl.Physiol* 93: 340-346, 2004.
47. Mulkey, D. K., E. M. Talley, R. L. Stornetta, A. R. Siegel, G. H. West, X. Chen, N. Sen, A. M. Mistry, P. G. Guyenet, and D. A. Bayliss. TASK channels determine pH sensitivity in select respiratory neurons but do not contribute to central respiratory chemosensitivity. *J.Neurosci.* 27: 14049-14058, 2007.
48. Noble, D. Claude Bernard, the first systems biologist, and the future of physiology. *Exp.Physiol* 93: 16-26, 2008.
49. Pardal, R., U. Ludewig, J. Garcia-Hirschfeld, and J. Lopez-Barneo. Secretory responses of intact glomus cells in thin slices of rat carotid body to hypoxia and tetraethylammonium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 2361-2366, 2000.
50. Patel, A. J. and E. Honore. Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci.* 24: 339-346, 2001.
51. Patel, A. J. and M. Lazdunski. The 2P-domain K⁺ channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Pflugers Arch.* 448: 261-273, 2004.

52. Pei, L., O. Wiser, A. Slavin, D. Mu, S. Powers, L. Y. Jan, and T. Hoey. Oncogenic potential of TASK3 (Kcnk9) depends on K⁺ channel function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100: 7803-7807, 2003.
53. Prabhakar, N. R. O₂ sensing at the mammalian carotid body: why multiple O₂ sensors and multiple transmitters? *Exp.Physiol* 91: 17-23, 2006.
54. Rajan, S., E. Wischmeyer, L. G. Xin, R. Preisig-Muller, J. Daut, A. Karschin, and C. Derst. TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J.Biol.Chem.* 275: 16650-16657, 2000.
55. Ramirez, J. M., S. W. Schwarzacher, O. Pierrefiche, B. M. Olivera, and D. W. Richter. Selective lesioning of the cat pre-Botzinger complex in vivo eliminates breathing but not gasping. *J.Physiol* 507 (Pt 3): 895-907, 1998.
56. Richter, D. W. Generation and maintenance of the respiratory rhythm. *J.Exp.Biol.* 100: 93-107, 1982.
57. Ruf, N., S. Bahring, D. Galetzka, G. Pliushch, F. C. Luft, P. Nurnberg, T. Haaf, G. Kelsey, and U. Zechner. Sequence-based bioinformatic prediction and QUASEP identify genomic imprinting of the KCNK9 potassium channel gene in mouse and human. *Hum.Mol.Genet.* 16: 2591-2599, 2007.
58. Salinas, M., R. Reyes, F. Lesage, M. Fosset, C. Heurteaux, G. Romey, and M. Lazdunski. Cloning of a new mouse two-P domain channel subunit and a human homologue with a unique pore structure. *J.Biol.Chem.* 274: 11751-11760, 1999.
59. Sanguinetti, M. C. and P. S. Spector. Potassium channelopathies. *Neuropharmacology* 36: 755-762, 1997.
60. Schultheiss, G. and M. Diener. Regulation of apical and basolateral K⁺ conductances in rat colon. *Br.J.Pharmacol.* 122: 87-94, 1997.
61. Shieh, C. C., M. Coghlan, J. P. Sullivan, and M. Gopalakrishnan. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol.Rev.* 52: 557-594, 2000.
62. Singer-Lahat, D., D. Chikvashvili, and I. Lotan. Direct interaction of endogenous Kv channels with syntaxin enhances exocytosis by neuroendocrine cells. *PLoS.ONE.* 3: e1381, 2008.
63. Slebos, D. J., S. W. Ryter, and A. M. Choi. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in pulmonary medicine. *Respir.Res.* 4: 7, 2003.
64. Takumi, T., H. Ohkubo, and S. Nakanishi. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* 242: 1042-1045, 1988.

65. Trinh, N. T., A. Prive, L. Kheir, J. C. Bourret, T. Hijazi, M. G. Amraei, J. Noel, and E. Brochiero. Involvement of KATP and KvLQT1 K⁺ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 293: L870-L882, 2007.
66. Vandenberg, C. A. Integrins step up the pace of cell migration through polyamines and potassium channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105: 7109-7110, 2008.
67. Wang, Z. Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Arch.* 448: 274-286, 2004.
68. Washburn, C. P., D. A. Bayliss, and P. G. Guyenet. Cardiorespiratory neurons of the rat ventrolateral medulla contain TASK-1 and TASK-3 channel mRNA. *Respir.Physiol Neurobiol.* 138: 19-35, 2003.
69. Wei, J. F., L. Wei, X. Zhou, Z. Y. Lu, K. Francis, X. Y. Hu, Y. Liu, W. C. Xiong, X. Zhang, N. L. Banik, S. S. Zheng, and S. P. Yu. Formation of Kv2.1-FAK complex as a mechanism of FAK activation, cell polarization and enhanced motility. *J.Cell Physiol* 217: 544-557, 2008.
70. Widdicombe, J. Reflexes from the lungs and airways: historical perspective. *J.Appl.Physiol* 101: 628-634, 2006.
71. Wonderlin, W. F. and J. S. Strobl. Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J.Membr.Biol.* 154: 91-107, 1996.
72. Zanzouri, M., I. Lauritzen, M. Lazdunski, and A. Patel. The background K(+) channel TASK-3 is regulated at both the transcriptional and post-transcriptional levels. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 348: 1350-1357, 2006.
73. Zuzarte, M., K. Heusser, V. Renigunta, G. Schlichthorl, S. Rinne, E. Wischmeyer, J. Daut, B. Schwappach, and R. Preisig-Muller. Intracellular traffic of the K⁺ channels TASK-1 and TASK-3: role of N- and C-terminal sorting signals and interaction with 14-3-3 proteins. *J.Physiol* 587: 929-952, 2009.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: „Claude Bernard, the first systems biologist, and the future of physiology.”	7
Abb. 2: Die K2P Familie	9
Abb. 3: Schema der Membrantopologie einer K2P Untereinheit	14
Abb. 4: TASK3 im Hirnstamm einer Ratte	18
Abb. 5: Atemrhythmus und -Muster	23
Abb. 6: Vorstellung von der neuronalen Verschaltung im Glomus caroticum	25
Abb. 7: Hypothese zum Transduktionsvorgang unter Hypoxie	26
Abb. 8: Sensitivität von Chemorezeptoren	30
Abb. 9: Durch zentrale und periphere Chemoreflexion vermittelte Ventilation in Ruhe	30
Abb. 10: Chemoreflexmechanismen zur Atmungsregulation	31
Abb. 11: Strategie der TASK3-Inaktivierung	32
Abb. 12: Modellanordnung der Ganzkörperplethysmographen	44
Abb. 13: Charakteristische Atemkurve	45
Abb. 14: mRNA-Expressionsmuster des murinen TASK3 mittels Realtime-PCR	48
Abb. 15.: Hyperkapnie Männchen – MV, TV, Frequenz	50
Abb. 16: Hyperkapnie Männchen: TI, TE	51
Abb. 17: Hyperkapnie Weibchen: MV, TV, Frequenz	52
Abb. 18: Respiratorisches Verhalten der Männchen unter akuter Hypoxie	54
Abb. 19: Ein- und Ausatmungszeit der Männchen unter Hypoxie	56
Abb. 20: Exspirationszeit und Spitzenfluss von Weibchen unter Sauerstoffmangel	57
Abb. 21: Weibchen unter Hypoxie: MV, TV, Frequenz	59
Abb. 22: Sukzessive Reduktion des Sauerstoffgehalts – MV, Frequenz	61
Abb. 23: Verändertes Atemmuster unter höhergradiger Hypoxie – PEF	62
Abb. 24: Inspirationszeit weiblicher Probanden	63
Abb. 25: Verstärkte Depression der Atmung bei Langzeithypoxie (männliche und weibliche Tiere gepoolt) – MV, Frequenz, PEF	66
Abb. 26: Exspirationszeit unter mehrstündiger Hypoxie	67
Abb. 27: Einfluss von volatilen Anästhetika auf die Atmung	69
Abb. 28: Atmungsmuster unter Isofluran	70

9. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Aquadest.	destilliertes Wasser
ARAS	aufsteigendes retikuläres Aktivierungssystem
ARDS	adult respiratory distress syndrome
AT1a	Angiotensin II-Rezeptor 1a
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	basic helix-loop-helix
bp	Basenpaare
bpm	beats per minute
CA	Carboanhydrase
cDNA	complementary DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
β-COP	β-coat protein
D ₂ -Rezeptor	Dopamin-2-Rezeptor
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DCV	dense core vesicle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DR	dorsale Raphekerne
DT	Diphtherietoxin
EAG	ether-a-go-go
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EEP	endexspiratorischer Druck
EIP	endinspiratory pressure
Epo	Erythropoetin
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
ER	endoplasmatisches Reticulum
GABA	γ-Aminobuttersäure
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
G _{i/0}	heterotrimeres G-Protein der G _i -Familie
GIRK	G-Protein regulated K ⁺ channel
G-Protein	Guaninnukleotidbindendes Protein
G _{q/11α}	heterotrimeres G-Protein der G _q -Familie
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEK	human embryonic kidney
HIF-1	hypoxia-inducible factor 1
His-98	Histidin an Position 98 der Primärsequenz
HO	Hämoxigenase
HRE	hypoxic response element
5-HT	5-Hydroxytryptamin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potenzial
IUP	International Union of Pharmacology

kb	kilobasen
K2P	2P-domain K ⁺ channel
K _{ATP}	ATP-abhängiger K ⁺ -Kanal
KCa	calciumabhängiger K ⁺ -Kanal
KCN-	K ⁺ channel-
Kir	einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal
Kv	voltage-gated K ⁺ channel
L-Typ-Kanal	longlasting-Kanal
M 1-4	Transmembrandomäne 1-4
MAZ	MYC-associated zinc finger protein
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MV	Minutenvolumen
NADPH	reduzierte Form des Nicotinsäureamidadenindinucleotidphosphat
neo	Neomycin
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NTS	Nucleus tractus solitarius
O ₂	Sauerstoff
ORF	offener Leserahmen
OSAS	obstruktives Schlafapnoesyndrom
P	Poredomäne
P2X2	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel,2
P _a CO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
P _a O ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PAS	Per/Arnt/Sim-Domäne aus eukaryotischen Transkriptionsfaktoren
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDZ	PSD95/SAP90, Discs large, Zonula occludentes-1
PEF	exspiratorischer Spitzenfluss
PIF	inspiratorischer Spitzenfluss
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
REM	rapid eye movement
(m)RNA	(messenger)Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
rT	reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean
SID	self-interacting domain
SIDS	sudden infant death syndrome
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
S ^P	Phosphoserin
Sp1	Sp1 transcription factor
β-ME	β-Mercaptoethanol
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TALK	TWIK-related alkaline pH-activated K ⁺ channel
TASK	TWIK-related acid-sensitive K ⁺ channel
TE/Te	Exspirationszeit
TEA	Tetraethylammonium
TH	Tyrosinhydroxylase
THIK	tandem pore domain halothane-inhibited K ⁺ channel
TI/Ti	Inspirationszeit
TierSchG	Tierschutzgesetz
TK	Thymidinkinase
TMS	Transmembransegment
TRAAK	TWIK-related arachidonic acid-stimulated K ⁺ channel
TREK	TWIK-related K ⁺ channel
TRESK	TWIK-related spinal cord K ⁺ channel
TRH	Thyrotropin-releasing Hormon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TV	Tidalvolumen
TWIK	two-pore weakly inwardly rectifying
ÜN	über Nacht
UTR	nichttranslatierte Region
UV	Ultraviolett
VRG	ventrale respiratorische Gruppe

10. Anhang

10.1 Eigene Veröffentlichungen

D Utz, C Sterner, I Tegtmeier, M Reichold, S Bandulik, J Thomas, J Barhanin, D Heitzmann, F Lesage, R Warth

Role of TASK3 potassium channels for the regulation of respiration

The 87th Annual Meeting of The German Physiological Society, Köln 2008 - Poster

10.2 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Utz
Vorname	Doris
Geburtsdatum	19.03.1985
Geburtsort	Oberviechtach
Staatsangehörigkeit	deutsch
Erstwohnsitz	Am Schallerhammer 23 D - 92539 Schönsee
Zweitwohnsitz	Franz-von-Taxis-Ring 49 a D - 93049 Regensburg
Familienstand	ledig, keine Kinder
Konfession	römisch-katholisch

SCHULBILDUNG

1991-1995	Volksschule Schönsee
1995-2004	Ortenburg-Gymnasium Oberviechtach, Stipendien der Oskar-Karl-Forster-Stiftung
Sommer 2004	Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM

2004-2006	Vorklinischer Teil des Studiums der Humanmedizin an der Universität Regensburg
Sommer 2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (ÄAppO 2002)
Ab Winter 2006	Klinischer Teil am Uniklinikum Regensburg
Ab März 2008	Stipendiatin in der Grundförderung des Cusanuswerks
November 2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (ÄAppO 2002)

PRAKTISCHE TÄTIGKEITEN IM RAHMEN DER ÄAPPO

August 2004	Krankenpflegepraktikum in der Inneren Medizin im Krankenhaus Burglengenfeld
--------------------	---

Sommer 2005	Praktikantin im Krankenhaus Oberviechtach (Innere Medizin) und in der Kinderklinik St. Hedwig in Regensburg
Februar/März 2007	Praxisfamulatur in Burglengenfeld (Allgemeinmedizin, Innere Medizin mit Substitutionstherapie und Palliativmedizin, Sportmedizin; Notfallmedizin)
Februar/März 2008	Famulatur in der Klinik für Innere Medizin am Krankenhaus St. Joseph-Stift in Dresden
März/April 2008	Famula im Institut für Radiologie und Neuroradiologie (mit Kinderradiologie) am Krankenhaus Barmherzige Brüder in Regensburg
September 2008	Famulatur in der Klinik für Anästhesiologie am Uniklinikum Regensburg
März 2009	Famula am Institut für Röntgendiagnostik des Klinikums der Universität Regensburg
31.08.2009	Beginn des Praktischen Jahres mit dem Wahlfach Anästhesie am Uniklinikum Regensburg
Ab 21.12.2009	Zweites Tertial in der Medizinischen Klinik am Spital Uster im Kanton Zürich
Ab 12.04.2010	Chirurgie am Caritaskrankenhaus St. Josef in Regensburg

BERUFLICHE LAUFBAHN

Seit 01.03.2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinik für Anästhesiologie am Uniklinikum Regensburg
------------------------	---

PROMOTION

Seit März 2007:	Promotion bei Prof. Dr. Warth am Institut für Physiologie der Universität Regensburg, NWF III/VKL
------------------------	---

10.3 Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

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

.....
Doris Utz

11. Danksagung

Last but not least sehe ich es nahezu als eine Verpflichtung an, mich bei all jenen Menschen zu bedanken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Bei der Institutsleitung Prof. Dr. Armin Kurtz bedanke ich mich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten.

Die Hauptrolle in diesem Projekt spielte zweifellos mein Betreuer Prof. Dr. Richard Warth, gleichzeitig der Urheber meiner Fragestellung. Sein entgegengebrachtes Vertrauen, nicht nur im Rahmen meiner Mitarbeit in seinem Labor schätze ich sehr.

Weiterhin bedanke ich mich herzlichst bei PD. Dr. Dirk Heitzmann und Dr. med. Stefan Jungbauer, die mir insbesondere bei Fragen bezüglich der Plethysmographie mit Rat und Tat zur Seite standen.

Den Versuchsaufbau für diese plethysmographischen Messungen stellte freundlicherweise Dr. Jörg Thomas aus der Anästhesie des Uniklinikums Ulm zur Verfügung.

Ein großes Dankeschön geht außerdem an Dr. F. Lesage (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne, F), der unserer Arbeitsgruppe sein Tiermodell des Task3^{-/-}-Phänotyps überließ.

Von ganzem Herzen Danke sagen möchte ich auch den beiden guten Seelen Christina Sterner und Ines Tegtmeier, die trotz der wahnsinnigen Geduld, die sie mit mir aufbringen mussten, immer offen und ehrlich zu mir waren und unaufhörlich darum bemüht waren, mir, wenn auch nur den geringsten Teil ihres gewaltigen technischen Know-hows beizubringen.

Zur ausgesprochen angenehmen Atmosphäre trugen nicht zuletzt auch meine ehemals noch Mitdoktoranden bei: Dr. rer. nat. Sascha Bandulik, Dr. rer. nat. Markus Reichold und Alexander März.

Natürlich auch allen namentlich ungenannt gebliebenen Mitarbeitern der Physiologie der Universität Regensburg, die, auf welcher Weise auch immer, zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, sei hier ein Satz gewidmet.

Wenigstens erwähnt seien auch meine Labormäuse, deren Kooperation doch so grundlegend für meine Arbeit war.

Besonderer Dank muss aber schließlich meinen Eltern, denen diese Arbeit auch gewidmet sein soll, gelten. Ihre Unterstützung von den frühesten Kindesbeinen an machte diesen Teil meines Lebensweges überhaupt erst möglich. Ihre sowohl ideelle, als auch materielle Förderung meiner Ausbildung war eine Voraussetzung dafür, die Zeit für meine Forschung aufwenden zu können.

