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

Untersuchungen an der Knockoutmaus zur Bedeutung des TASK1-Kaliumkanals für die Atmungs- und die Blutdruckregulation

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Stefan Jungbauer

2010

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

Untersuchungen an der Knockoutmaus zur Bedeutung des TASK1-Kaliumkanals für die Atmungs- und die Blutdruckregulation

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Stefan Jungbauer

2010

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Richard Warth
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Matthias Mack
Tag der mündlichen Prüfung:	17.05.2010

Für meine Eltern und meine Schwester Monika

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 7
1.1 Grundlegende Funktionen von Kalium-Kanälen 7
1.2 K^+-Kanal-Familien und deren Struktur 8
1.3 TASK1: Biophysik, Regulation, Expression 10
1.4 Hyperaldosteronismus als Ursache arterieller Hypertension 13
1.5 Grundlagen der zentralen und peripheren Chemorezeption 15
1.6 Potentielle Rolle von TASK1 in der Atmungsregulation 16

2. Zielsetzung 18
2.1 Auswirkungen des Hyperaldosteronismus 18
2.2 Respiration 18

3. Methoden 19
3.1 Mäuse 19
3.2 Genotypisierung 20
3.3 Blutdruckmessung 22
3.4 Messung der Hauttemperatur als Maß für die periphere Durchblutung 23
3.5 Plethysmographie 23
3.6 Statistik 26

4. Ergebnisse 27
4.1 Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen 27
4.2 Thermokamera-Untersuchung von Wildtyp- und TASK1$^{-/-}$-Mäusen 28
4.3 Respiration 29
4.3.1 Abnehmende Sauerstoffkonzentration als Atemstimulus 30
4.3.2 Hyperkapnie 35
4.3.3 Langzeithypoxie 41
4.3.4 Überprüfung der schnellen Hypoxieantwort 48
4.3.5 Isofluran 50
4.3.6 Hyperkapnie unter Isofluran 53

5. Diskussion 55
5.1 TASK1-Knockout führt zu Hyperaldosteronismus und arterieller Hypertension 55
5.2 Respiration 57
5.2.1 Kein Einfluss des TASK1-Knockout auf die Sauerstoffantwortkurve 58
5.2.2 Verkleinerung der Penh durch den TASK1-Knockout 58

5.2.3 Schnelle Hypoxieantwort: Attenuierter Frequenzanstieg durch den TASK1-Knockout....59
5.2.4 Langzeithypoxie....60
5.2.5 Hyperkapnie: CO_2 unabhängig vom Genotyp als starker Atemstimulus....60
5.2.6 Isofluran: Suppression des Atemantriebs bei beiden Genotypen....61
5.3 Physiologische Bedeutung des TASK1-Knockouts....62

6. Zusammenfassung....64
7. Literaturverzeichnis....66
8. Eigene Veröffentlichungen....74
9. Lebenslauf....75
10. Eidesstattliche Erklärung....76
11. Danksagung....77

1. Einleitung

1.1 Grundlegende Funktionen von Kalium-Kanälen

Kalium (K^+) -Kanäle liegen in der Membran praktisch aller Körperzellen, um dort im Zusammenspiel mit anderen Ionenkanälen die elektrischen Eigenschaften zu bestimmen. Die Beteiligung der K^+-Kanäle an diversen physiologischen Prozessen beruht auf zwei wichtigen Aspekten. Einerseits können diese Proteine zusammen mit anderen Ionenkanälen über die Membran hinweg ein elektrisches Potential aufbauen. Andererseits kann durch die Pore des Kanals, deren Offenwahrscheinlichkeit durch verschiedenste Stimuli gesteuert wird, K^+ hindurchdiffundieren und damit in der Regel von intrazellulär nach extrazellulär gelangen. Mit Hilfe dieser elektrochemischen Grundlagen lässt sich verstehen, wie die Kaliumkanäle an zahlreichen zellbiologischen Prozessen mitwirken.

Durch die Kaliumleitfähigkeit wird z.B. das Ruhemembranpotential der Zellen aufrechterhalten, welches eine wichtige elektrische Triebkraft für zahlreiche Transportprozesse darstellt. Der Kaliumstrom als solcher ist entscheidend bei der Kaliumausscheidung in der Niere oder für das Recycling von Kalium, wenn es von Pumpen wie der H^+/K^+-ATPase in die Zelle aufgenommen wurde: Durch die in den Parietalzellen der Magenschleimhaut gelegene H^+/K^+-ATPase werden H^+-Ionen ins Lumen gepumpt und parallel dazu werden K^+-Ionen in die Zelle aufgenommen. Um die Magensäure-Produktion aufrechtzuerhalten, müssen die aufgenommen K^+-Ionen wieder zurück in den Extrazellulärraum gelangen, damit dort ausreichend K^+ für eine weitere Pumpentätigkeit zur Verfügung steht (Heitzmann *et al.*, 2004; Heitzmann and Warth, 2007).

Neben ihren Funktionen an elektrisch erregbaren Zellen, wie z.B. die Beendigung des Aktionspotentials an Nervenzellen, spielen K^+-Kanäle eine wichtige Rolle hinsichtlich diverser Regulationsprozesse an nicht erregbaren Zellen (Miller, 2000). Das Ruhemembranpotential zahlreicher Zellen wird durch das Kaliumionengleich-gewichtspotential bestimmt und liegt in einem Bereich von ca. -90 mV. Durch die hohe intrazelluläre K^+-Konzentration ist die chemische Triebkraft nach außen gerichtet. Aufgrund der selektiven Permeabilität der Zellmembran bleibt aber für jedes K^+-Ion ein Anion im Zytoplasma zurück und führt so zu einer negativen Ladung im Zellinneren (elektrische Triebkraft), wodurch sich letztlich das Diffusionspotential ausbildet. Die Konstanthaltung des Plasmakaliumspiegels zwischen 3,5 und 5,5 mmol/l ist für die Funktion der einzelnen Zellen und damit des Gesamtorganismus von entscheidender Bedeutung. Dies wird durch eine Kaliumausscheidung in der Niere erreicht, wobei hauptsächlich in den distalen Nephronabschnitten verschiedene Kaliumkanäle als Sekretionswege fungieren. Des Weiteren sind Kaliumkanäle an der Konstanthaltung des Zellvolumens beteiligt (Weyand *et al.*, 1998; Sand *et al.*, 2004) und haben einen Einfluss

auf die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung, was sich z.B. durch ein verändertes Expressionsmuster einzelner Kaliumkanäle in Tumorzellen zeigt (Patel and Lazdunski, 2004; Kunzelmann, 2005).

Aufgrund der Bedeutung der Kaliumkanäle für vielfältige und ganz unterschiedliche zellbiologische Prozesse ist es nicht verwunderlich, dass für diese Proteinfamilie zahlreiche verschiedene Gene kodieren. Laut der Human Genom Organisation (HUGO) umfasst die Gruppe der Kaliumkanal-alpha-Untereinheiten 78 Gene.

Die Nomenklatur der Kaliumkanäle ist leider recht unübersichtlich, weil aus historischen Gründen für einzelne Kanäle mehrere Namen existieren. Um die Orientierung zu erleichtern, wurde von der Human Genome Organisation die „KCN“-Klassifikation eingeführt. Nach dieser Nomenklatur wird jeder Kaliumkanal-alpha-Untereinheit und den akzessorischen beta-Untereinheiten ein Name zugeordnet, der mit KCN beginnt gefolgt von einem weiteren Buchstaben und einer Zahl, z.B. KCNA1. Neben den historischen Benennungen werden in dieser Arbeit die "KCNx"-Bezeichnungen benutzt.

1.2 K^+-Kanal-Familien und deren Struktur

Die aktuelle Einteilung der Kaliumkanalfamilien bzw. die Abgrenzung einzelner Kaliumkanäle voneinander basiert auf der Entschlüsselung der Aminosäuresequenzen, die auch Hydrophobizitätsanalysen hinsichtlich vorhandener Transmembrandomänen erlaubt. Wegen der Lipiddoppelmembran bedarf es im Bereich der alpha-Helices einer Primärstruktur, die überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren besteht. Im wässrigen Milieu des Intra- bzw. des Extrazellulärraumes überwiegen hingegen Proteinabschnitte aus hydrophilen Aminosäuren. Man unterscheidet Familien mit zwei bzw. sechs transmembranären Domänen, die nur eine porenbildende Schleife („P loop“) besitzen, von der zuletzt entdeckten Kanalfamilie, welche durch vier transmembranäre Regionen und zwei porenbildende Schleifen gekennzeichnet ist (2P-Domänen-Familie; siehe Abb. 1).

Ein funktioneller Kaliumkanal (Quartärstruktur) setzt sich in der Regel aus vier alpha-Untereinheiten (Tertiärstruktur) zusammen. Eine Ausnahme stellen die Kanäle mit vier transmembranären Domänen und zwei porenbildenden Schleifen dar, welche nur aus zwei alpha-Untereinheiten aufgebaut sind. Grundsätzlich können sich gleiche alpha-Untereinheiten zu einem sogenannten homomeren Proteinkomplex zusammenlagern. Es gibt aber auch Heteromerbildung aus verschiedenen alpha-Untereinheiten, für die TASK1/TASK3-Heteromere beispielhaft genannt werden können (Czirjak and Enyedi, 2002). Weiterhin erhöht sich die Diversität durch die Anlagerung von beta-Untereinheiten. Diese besitzen selbst keine Kanaleigenschaften, verändern aber die physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften des funktionellen Kanals (Lesage *et al.*, 1997; Jenkinson, 2006). Durch all diese Kombinationsmöglichkeiten „gelingt“ es der Natur, die Kaliumkanäle bezüglich der individuellen Erfordernisse der Zelle zu modifizieren.

Die porenbildende Region innerhalb der Tertiärstruktur der alpha-Untereinheit weist bei den meisten Kaliumkanälen die charakteristische Aminosäuresequenz Glycin-Tyrosin-Glycin auf, was auch als sogenannte „Porensignatur“ bezeichnet wird. Auf der oben beschriebenen Aminosäurenabfolge basiert die selektive Durchlässigkeit der Kanalpore. Durch die Carbonylsauerstoffe des Tyrosin- und des inneren Glycinrestes aller Untereinheiten entsteht nämlich eine Ringstruktur, welche spezifisch die Hydrathülle des K^+-Ions perfekt nachahmt (Doyle *et al.*, 1998; Patel and Honore, 2001).

Die zentrale Rolle im Rahmen dieser Arbeit spielt mit TASK1 ein Vertreter aus der 2P-Domänen-Familie, weswegen auf diese im Folgenden näher eingegangen werden soll.

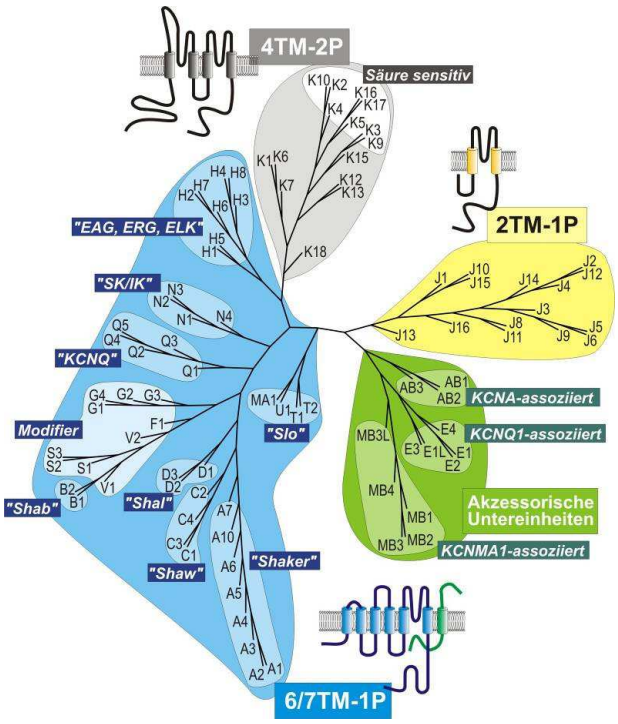

Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der Kaliumkanaluntereinheiten:

Das abgebildete Dendrogramm bietet einen Überblick über die bekannten Kaliumkanäle und deren Struktur. Der Namensgebung liegt die KCNx-Nomenklatur der „Human Genom Organisation“ (HUGO) zugrunde. Zur einfacheren Darstellung wurde das Kürzel KCN vor dem jeweils spezifischen Buchstaben weggelassen (z.B. „A1“ anstelle von „KCNA1“). Die drei Familien porenbildender α-Untereinheiten unterscheiden sich durch ihre Topologie.

4TM-2P (grau): α-Untereinheiten mit vier transmembranären Domänen (4TM) und zwei porenbildenden Schleifen (2P-Domänen-Familie)

2TM-1P (gelb): α-Untereinheiten mit zwei transmembranären Domänen (2TM) und einer porenbildenden Schleife (1P)

6/7TM-1P (blau): α-Untereinheiten mit sechs oder sieben transmembranären Domänen (6/7TM) und einer porenbildenden Schleife (1P). Akzessorische β-Untereinheiten (grün) assoziieren mit einzelnen der dargestellten α-Untereinheiten.

1.2.1 4TM-2P-Kanäle (2P-Domänen-Familie)

Die ersten Vertreter dieser Kaliumkanalfamilie wurden im Jahre 1995 aus *Saccaromyces cerevisiae* und *Caenorhabiditis elegans* isoliert (Ketchum *et al.*, 1995). Im Jahre 1996 wurde dann aus einer humanen cDNA Datenbank TWIK1 (**T**andem of P domains in a **W**eak **I**nward rectifier $\mathbf{K^+}$-channel) oder KCNK1 als erster Vertreter dieser Kaliumkanalfamilie beim Menschen kloniert (Lesage *et al.*, 1996). Im menschlichen Genom sind bis jetzt weitere 14 Vertreter dieser Familie entdeckt worden.

Der strukturelle Aufbau der Kanaluntereinheiten ist durch vier transmembranäre und zwei porenbildende Abschnitte gekennzeichnet, sodass sich für einen funktionsfähigen Kanal Dimere bilden müssen (Lesage *et al.*, 1997). Wegen ihrer hohen Offenwahrscheinlichkeit bei negativen Membranpotentialen werden die 4TM-2P-Kanäle auch als „Hintergrund-Kaliumkanäle“ bezeichnet und für die Aufrechterhaltung des physiologischen Membranpotentials in verschiedensten Geweben verantwortlich gemacht (Lesage and Lazdunski, 2000). Ein weiteres Charakteristikum ist die komplexe Regulation, der diese Kanäle unterliegen. Die Kanalaktivität kann durch folgende Faktoren beeinflusst werden: Hypoxie, Arachidonsäurederivate, den intra- und extrazellulären pH-Wert, G-Proteine, Kinasen, Membranspannung, Temperatur, akzessorische Proteine und eine Reihe von Pharmaka (z.B. Bupivacain, volatile Anaesthetika) (Lesage *et al.*, 2000; Heitzmann and Warth, 2008).

1.3 TASK1: Biophysik, Regulation, Expression

TASK1 (KCNK3), **T**wik related **a**cid **s**ensitive $\mathbf{K^+}$-channel, wurde 1997 aus einer humanen Nieren-cDNA-Bank isoliert. Er besteht aus 395 Aminosäuren und gehört aufgrund der Kaliumkanaluntereinheitenstruktur in die 2P-Domänen-Familie (siehe Abb. 1 und 2). Die elektrophysiologische Charakterisierung erfolgte durch die Expression in *Xenopus laevis* Oozyten und an transfizierten COS-Zellen (Fibroblasten-Zelllinie). Es zeigt sich bei symmetrisch hohen Kaliumkonzentrationen ein spannungsabhängiger Strom mit einer instantanen Aktivierungskinetik, der keine Inaktivierung zeigt. Jene Eigenschaften prädisponieren diesen Kanaltyp zur Stabilisierung des Ruhemembranpotentials. Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die starke pH-Abhängigkeit des Stromes innerhalb physiologischer Bereiche (siehe Abb. 3). Bei pH 7,7 werden 90% der maximalen Stromstärke erreicht, während es bei pH 6,7 nur 10% sind (Duprat *et al.*, 1997).

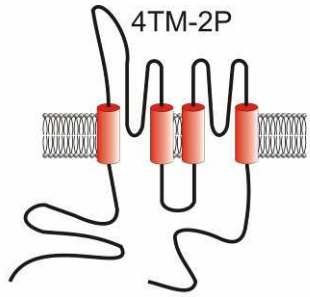

Abb. 2: Schematische Zeichnung der Struktur von TASK1 mit vier transmembranären Domänen und zwei porenbildenden Regionen.

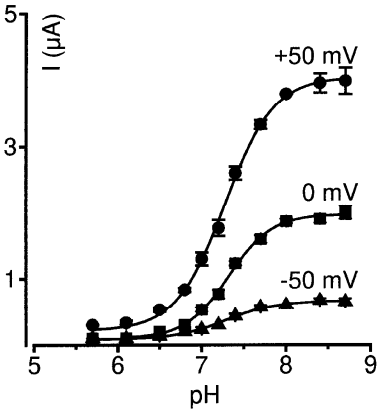

Abb. 3: Abhängigkeit des TASK1-Stroms vom extrazellulären pH-Wert und der Klemmspannung (dargestellt an einer *Xenopus* Oozyte, aus (Duprat *et al.*, 1997))

Neben der Hemmung durch niedrigen extrazellulären pH lässt sich TASK1 auch durch Hypoxie inhibieren (Buckler, 1997). Für die O_2-Sensibilität wird vermutlich ein Kofaktor oder zytosolischer Messenger benötigt, weil bei patch-clamp Messungen an Glomus caroticum Zellen am exzidierten Membranfleck keine Sauerstoffsensibilität mehr nachweisbar ist. Hierbei könnte u.a. die NADPH-Oxidase NOX4 wichtig sein, weil diese laut Lee et al. bei der O_2-bedingten Regulation von TASK1 modulierend und sauerstoffdetektierend wirkt (Lee *et al.*, 2006). Während es durch Lokalanästhetika wie Bupivacain ebenfalls zu einer Hemmung des Kanals kommt, zeigt sich bei der Applikation volatiler Anaesthetika, wie Halothan oder Isofluran, eine Aktivierung (Patel *et al.*, 1999). Weiterhin werden TASK1-Kanäle durch $G\alpha_q$-gekoppelte Rezeptoren moduliert, zu denen u.a. NKIR (Neurokinin-1-Rezeptoren), AT1a Angiotensin II-Rezeptoren, α_1 adrenerge Rezeptoren und 5-HT_2 (5-Hydroxytryptamin*)*-Rezeptoren zählen (Czirjak *et al.*, 2000; Goldstein *et al.*, 2001, Lesage, 2003). Darüber hinaus kann TASK1 durch Barium, Quinin, Quinidin und Zink blockiert werden, aber auch das endogene Cannabinoid Anandamide, das Amid der Arachidonsäure, hat sich als direkter und selektiver Blocker erwiesen (Maingret et al., 2001). Ein weiterer wichtiger Aspekt in Bezug auf die Funktion ist die Ausbildung von Heterodimeren bestehend aus einer TASK1- und TASK3-Kaliumkanaluntereinheit, die dann zusammen einen funktionsfähigen Kaliumkanal bilden. Durch die Kombination könnte es so zu einer genaueren Anpassung an die physiologischen Anforderungen der Zelle kommen und zu einer feineren Regulation der

Kanalaktivität (Czirjak *et al.*, 2002). Durch Experimente auf zellulärer Ebene wurde festgestellt, dass die funktionelle Expression des TASK1 bzw. TASK3 von dem Protein 14-3-3 abhängt. Die Daten weisen daraufhin, dass jenes Eiweißmolekül für den Einbau des TASK1 und TASK3 in die Zelloberfläche bedeutend zu sein scheint (Rajan *et al.*, 2002).

Die in Abbildung 4 dargestellten Expressionsdaten der Unigene Datenbank weisen daraufhin, dass TASK1 vorwiegend in neuronalen Strukturen vorkommt. Mittlerweile gibt es zahlreiche Hinweise, dass die TASK1-Kaliumkanaluntereinheiten durch ihre pH- und O_2-Sensibilität, aber auch mit anderen Eigenschaften in diversen Zelltypen spezifische Funktionen wahrnehmen (Buckingham *et al.*, 2005; Duprat *et al.*, 2007). Im Anschluss wird auf einige Expressionsorte und, soweit bekannt, auch auf die Funktion von TASK1 eingegangen.

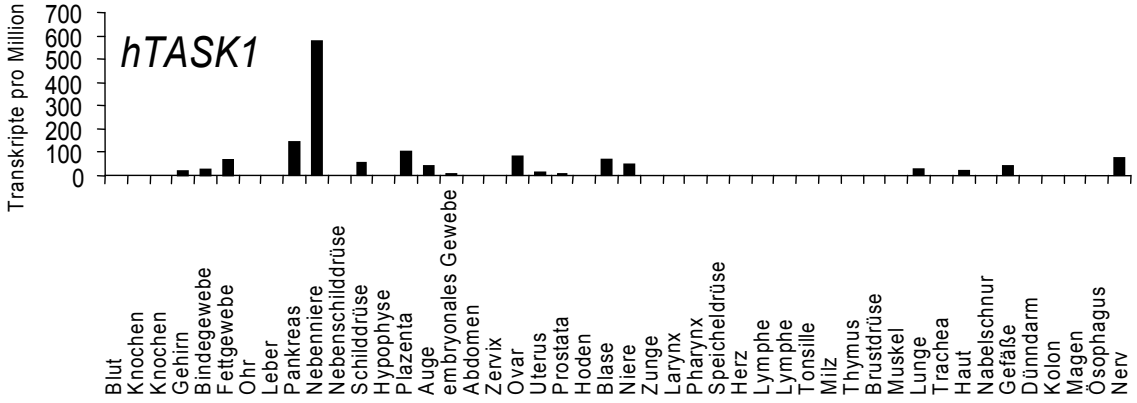

Abb. 4: mRNA-Expressionsmuster des humanen TASK1 entnommen aus der Unigene Database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unigene).

Zusammen mit TWIK1 kommt TASK1 bei der Maus in den sensorischen Zellen der Papillae foliatae und vallatae vor und detektiert dort die saure Geschmacksempfindung (Richter *et al.*, 2004). Weiterhin konnte TASK1 durch die Isolation aus einer Maus-cDNA-Datenbank sowohl in ventrikulären, als auch in atrialen Kardiomyozyten nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass durch die Hintergrundleitfähigkeit die kardiale Zellaktivität mitbestimmt wird (Kim *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2002). Eine neuere Studie liefert Hinweise darauf, dass TASK1 während der Plateauphase der Kardiomyozyten aktiv ist und dieser Strom via α_{1A} adrenerger Rezeptoren blockierbar ist (Putzke *et al.*, 2007). Interessanterweise basiert der arrhythmogene Effekt des Platelet-Activating-Factor auf einer Inhibierung des TASK1 (Barbuti *et al.*, 2002). Trotz des relativ breit gestreuten Vorkommens von TASK1 sticht die Nebenniere als der Ort mit der höchsten Expressionsrate hervor. Durch elektrophysiologische Untersuchungen an den glomerulären Zellen aus der Rattennebenniere gibt es Hinweise, dass TASK1 und TASK3

die dominierenden Hintergrundkaliumkanäle sind, und auch die einzigartige Kaliumsensitivität scheint durch 2P-Domänen-Kanäle gesteuert zu sein. Eine steigende extrazelluläre Kaliumkonzentration führt entsprechend der Nernst-Gleichung zu einer Zelldepolarisation, was zu einem gesteigerten Ca^{2+}-Einstrom über spannungsabhängige Kalziumkanäle und in der Folge zu einer gesteigerten Transkription der Aldosteronsynthase führt (Czirjak *et al.*, 2000; Spat, 2004). Im Vergleich zwischen Wildtyptieren und den TASK1-defizienten Mäusen konnte bei weiblichen Knockouttieren ein Hyperaldosteronismus festgestellt werden (Heitzmann *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2008).

Die potentielle Rolle von TASK1 in der Atmungsregulation wird im Abschnitt über die Chemorezeption näher erläutert.

1.4 Hyperaldosteronismus als Ursache arterieller Hypertension

Durch den TASK1-Knockout an der Maus tritt ein Hyperaldosteronismus auf. Das Mineralokortikoid Aldosteron besitzt eine zentrale Rolle in der Regulation des extrazellulären Flüssigkeits- und Salz-Haushaltes. Zum besseren Verständnis der durchgeführten Experimente soll in kurzen Zügen Grundlegendes zum Renin-Angiotensin-Aldosteron-System erklärt werden (siehe Abb. 5).

Das in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde produzierte Mineralokortikoid Aldosteron beeinflusst den extrazellulären Flüssigkeits- und Salzhaushalt. Die Regulation der Aldosteronsekretion erfolgt prinzipiell auf zwei verschiedene Arten: Durch einen erhöhten Kaliumplasmaspiegel (direkter Weg) bzw. durch eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems steigt die Aldosteronkonzentration an (indirekter Weg). Im Rahmen des direkten Weges wird an der Nebenniere selbst die Aldosteronsekretion durch den Kalium-Plasmaspiegel beeinflusst. Eine erhöhte Kaliumzufuhr stimuliert die Aldosteronfreisetzung. Auf zellulärer Ebene konnte eine zentrale Rolle von TASK1 und TASK3 für die hohe Kaliumsensitivität der glomerulären Nebennierenzellen nachgewiesen werden (Czirjak *et al.*, 2000; Spat, 2004).

Der indirekte Weg führt durch den ausgeklügelten Feedback-Mechanismus des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zu einer gesteigerten oder verminderten Aldosteron-Ausschüttung. Der genaue Ablauf der Kaskade, die zu einer vermehrten Salz- bzw. Wasserretention führt, ist in Abbildung 5 dargestellt. Die zentrale Rolle kommt hierbei der gesteigerten Aldosteronsekretion zu. Angiotensin II bewirkt durch eine Reduktion der Kaliumleitfähigkeit eine Depolarisation der Glomerulosazellen, was letztlich über mehrere Schritte zu einer gesteigerten Aldosteronsynthese führt (Czirjak *et al.*, 2000). Im distalen Nephron kommt es durch Aldosteron dann zu einer Na^+-Retention und einer K^+-Sekretion.

Zusammenfassend dient Aldosteron über die vermehrte Natriumretention und eine gesteigerte Kaliumausscheidung der Regulation des extrazellulären Flüssigkeits- und Salzhaushaltes. Ein Hyperaldosteronismus geht aufgrund der vermehrten Salzretention häufig mit einem Hypertonus einher. Durch eine fehlregulierte Aldosteronsekretion und dem daraus resultierenden Hyperaldosteronismus werden beim Menschen 3-10% der Bluthochdruckerkrankungen verursacht (Nussberger, 2003; Calhoun, 2006).

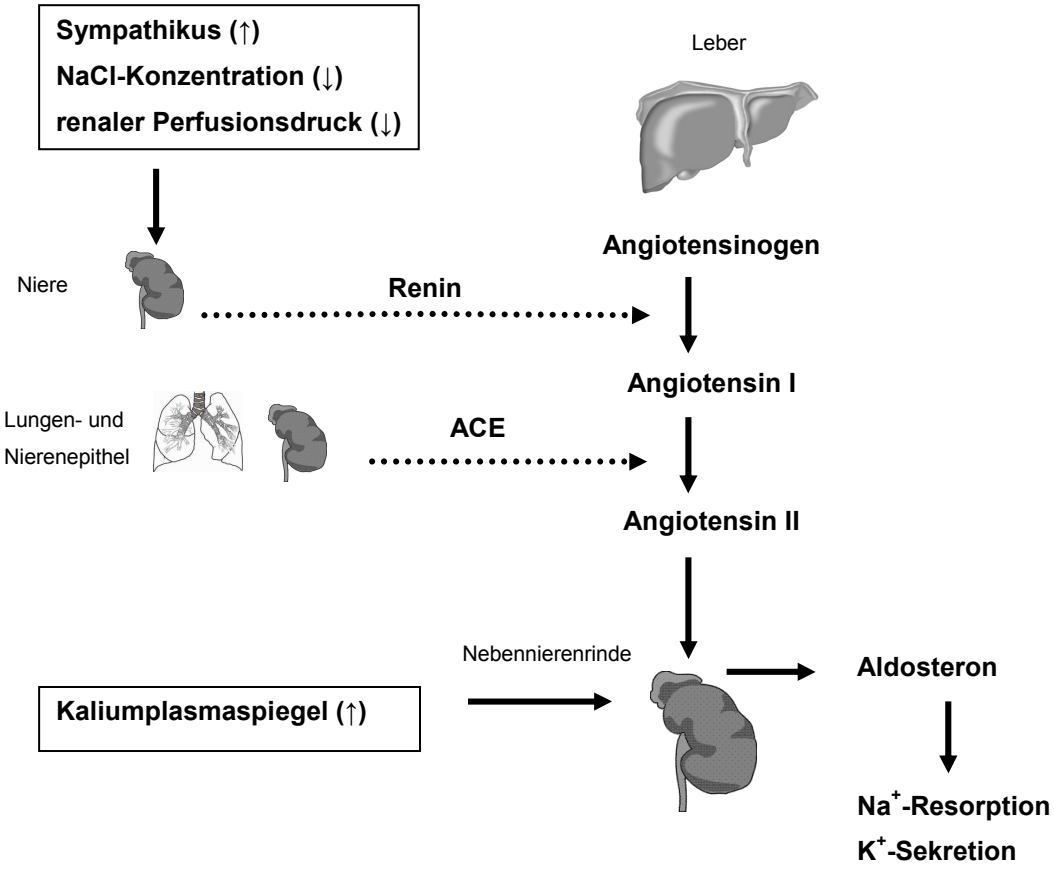

Abb. 5: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems: Die Reninsekretion wird durch einen verminderten renalen Perfusionsdruck, eine verminderte NaCl-Konzentration im distalen Nierentubulus bzw. durch eine gesteigerte Sympathikusaktivität stimuliert. Durch Renin und das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) wird Angiotensinogen in Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II führt dann in der Nebennierenrinde zu einer gesteigerten Aldosteronsynthese. Die Aldosteronsekretion kann zudem durch einen erhöhten Kalium-Plasmaspiegel stimuliert werden. Durch die vermehrte Natriumretention und eine gesteigerte Kaliumausscheidung ist Aldosteron ein wichtiger Faktor in der Regulation des extrazellulären Flüssigkeits- und Salzhaushaltes.

1.5 Grundlagen der zentralen und peripheren Chemorezeption

Durch die Atmung werden die O_2-Konzentration, der CO_2-Gehalt und der pH im Blut bzw. Liquor reguliert. Beispielsweise erfordern sich ändernde Partialdrücke von O_2 und CO_2 in der Umgebungsluft oder metabolisch bedingte Änderungen des O_2-Bedarfs unter körperlicher Belastung eine Anpassung. Die stärkste Stimulation erfährt die Ventilation durch einen Anstieg des arteriellen CO_2-Gehalts (siehe Abb. 6). Einen flacheren Verlauf zeigt die Antwortkurve auf Veränderungen bei der O_2-Konzentration und beim pH. Dies basiert auf einem komplexen Netzwerk aus peripheren und zentralen Chemorezeptoren.

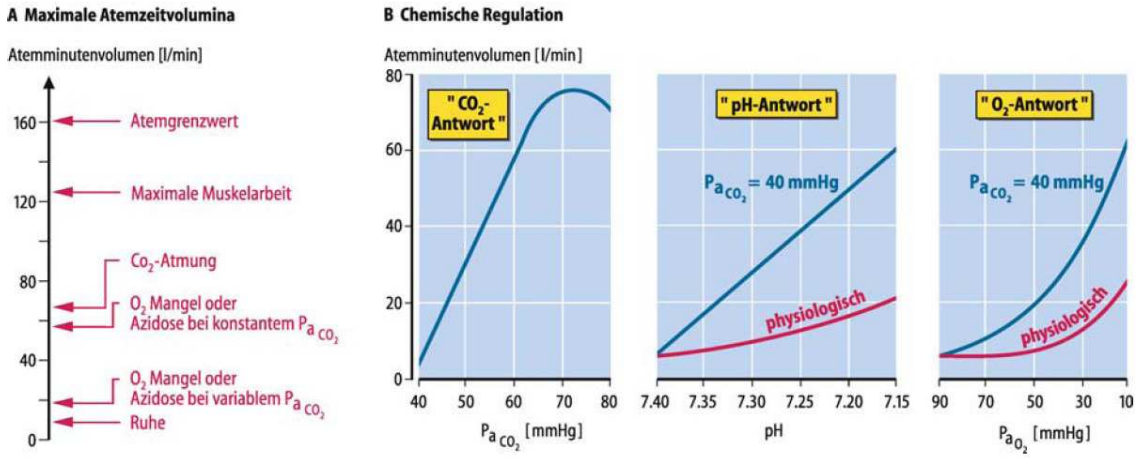

Abb 6: Änderung der Atemzeitvolumina bei willkürlicher Mehrventilation und Atmungsregulation (aus Schmidt, Lang, Physiologie des Menschen, 30. Auflage)
A) Maximale Atemzeitvolumina, die bei verschiedenen Regulationsprozessen erreicht werden können. B) Sog. Antwortkurven der Atmungsregulation. Die chemorezeptive Regulation besteht in einer "Antwort auf Änderungen des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes, des arteriellen CO_2-Partialdruckes und der arteriellen H^+-Konzentration“: *Rote Kurven* physiologische Ventilationsantwort, *blaue Kurven* Ventilationsantwort bei konstantem alveolären CO_2-Partialdruck.

Die wichtigste Rolle in der peripheren Chemorezeption spielen spezialisierte Zellen (Typ I-Glomuszellen) in den Glomera carotica und den Glomera aortica. Aufgrund ihrer Lage an der Karotis-Gabel und entlang des Aortenbogens weisen sie eine hohe Durchblutungsrate auf, was eine gute Basis für die Messung der arteriellen Blutgase und des pH-Wertes darstellt. Über afferente Bahnen des N. glossopharyngeus bzw. des N. laryngeus superior gelangen die Messimpulse zu den Neuronen der dorsalen respiratorischen Gruppe in der Medulla oblongata (Lahiri *et al.*, 2006; Lahiri and Forster, 2003; Weir *et al.*, 2005).
Die zentrale Chemorezeption basiert auf Neuronen in ventralen Anteilen des Hirnstamms, im Locus coeruleus und im respiratorischen Netzwerk selbst. Die Aktivität dieser Messstationen wird durch den pO_2 und pCO_2 bzw. den pH-Wert des Liquors beeinflusst. Das respiratorische Netzwerk umfasst eine ventrale respiratorische Gruppe (Bötzinger-,

Prä-Bötzinger-Komplex und kaudale ventrale respiratorische Gruppe) und eine dorsale respiratorische Gruppe mit Neuronen in den Kerngebieten des Nucl. tractus solitarius (Lee *et al.*, 2006).

Durch diverse Studien haben sich zwei grundlegende Mechanismen der Signaltransduktion in chemosensiblen Zellen herauskristallisiert. Auf der einen Seite steht das mitochondriale Modell, auf das im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden soll. Wichtiger für das Verständnis der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente ist die Hypothese, dass Ionenkanäle in der Plasmamembran für die Chemosensibilität verantwortlich sind. Hypoxie- bzw. pH-sensible Kaliumkanäle beeinflussen durch eine Veränderung der Offenwahrscheinlichkeit und der damit einhergehenden Depolarisation bzw. Hyperpolarisation die Signalkaskade. Vor über 20 Jahren konnte bereits ein durch Hypoxie hemmbarer Kaliumstrom in Typ-1-Glomuszellen nachgewiesen werden (Lopez-Barneo *et al.*, 1988).

Neben den Vertretern aus der 2-P-Domänen-Kanalfamilie ist auch für MaxiK (KCNMA1) und Kv-Kanäle (aus der 6/7TM-1P-Kanalfamilie) eine Regulation durch Hypoxie, Hyperkapnie und Azidifizierung bekannt (Perez-Garcia *et al.*, 2000a; Perez-Garcia *et al.*, 2000b). Wegen der Komplexität des respiratorischen Netzwerkes ist die Relevanz des einzelnen Kanals für die Funktion der Chemorezeption noch weitgehend unklar.

1.6 Potentielle Rolle von TASK1 in der Atmungsregulation

Aufgrund der biophysikalischen Charakteristika und des Expressionsmusters stellt die Rolle von TASK1 hinsichtlich der Atmungsregulation ein wichtiges Forschungsfeld dar. In jüngster Zeit wurde an Typ-1-Glomuszellen und an der neuroepithelialen Zelllinie H146, die aus einem Lungencarcinom hervorgeht und als etabliertes Zellmodell für die O_2-messenden neuroepithelialen Zellen gilt, unter Hypoxie ein TASK1 bzw. TASK3 ähnlicher Kaliumstrom detektiert (O'Kelly *et al.*, 1999; Buckler *et al.*, 2000; Hartness *et al.*, 2001; Williams and Buckler, 2004). Zusammen mit dem immunhistochemischen Nachweis von TASK1, TASK2 und TASK3 in den Typ-1-Glomuszellen des Glomus caroticum der Ratte lässt sich so darauf schließen, dass TASK 1 an der peripheren Chemorezeption beteiligt ist (Yamamoto *et al.*, 2002). In weiteren Studien wurden durch die Untersuchung glatter Muskelzellen der Pulmonalarterien Daten gewonnen, die darauf hindeuten, dass TASK1 an der Regulation des pulmonalen Gefäßtonus mitwirkt. Extrazelluläre pH-Veränderungen könnten so durch die Blockade von TASK1 und die daraus resultierende Kontraktion der glatten Muskulatur für die pulmonale Vasokonstriktion unter Hypoxie verantwortlich sein (Gurney *et al.*, 2003; Olschewski *et al.*, 2006). Die Regulation der Atmung durch den arteriellen CO_2- und O_2-Gehalt basiert nicht nur auf der peripheren Chemorezeption, sondern es sind auch mehrere Kerngebiete im Hirnstamm daran beteiligt. TASK1- und

TASK3-mRNA konnte in zahlreichen respiratorischen Neuronengruppen, wie dem Raphekern, dem Nucl. trapezoideus, dem Prä- Bötzinger und dem Bötzinger- Komplex, dem Nucl. reticularis lateralis, dem Nucl. coeruleus und in Bereichen der ventrolateralen Medulla nachgewiesen werden. Daneben kommt TASK1 noch in den motorischen Neuronen des N. hypoglossus und des N. facialis vor. Vermutlich über die pH-Sensitivität nimmt TASK1 somit Einfluss auf die motorischen Neuronen und die atmungssteuernden Zentren (Medhurst *et al.*, 2001; Talley *et al.*, 2001; Washburn *et al.*, 2003).

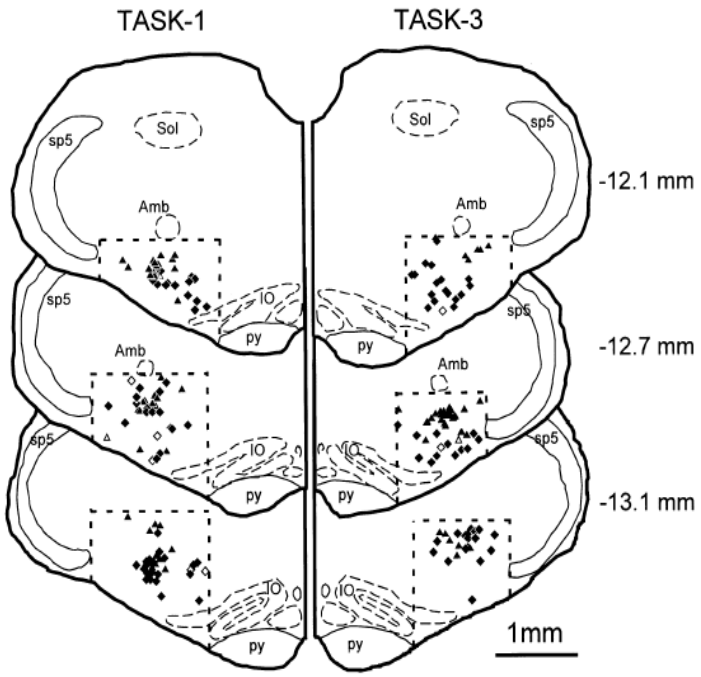

Abb. 7: TASK1-Lokalisation im Hirnstamm: TASK1- bzw. TASK3-mRNA ist in den meisten Neuronen der ventrolateralen Medulla oblongata, die an der Atmungs- und Kreislaufregulation beteiligt sind, vorhanden. Die respiratorischen Neurone wurden anhand des Neurokinin-1-Rezeptors (NK1R) anatomisch detektiert, während die an der Kreislaufsteuerung beteiligten C1 adrenergen Neurone durch die Tyrosin-Hydroxylase identifiziert wurden. Auf der linken Seite symbolisieren die gefüllten Dreiecke TASK1 in NK1R-Zellen und die gefüllten Rauten stehen für TASK1 in C1-Neuronen, während auf der rechten Seite die TASK3- Lokalisation dargestellt ist (aus (Washburn *et al.*, 2003)).

2. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von TASK1 in der Nebennierenrinde und bei der Atmungsregulation mit Hilfe der TASK1-Knockoutmaus untersucht.

2.1 Auswirkungen des Hyperaldosteronismus

Die hohe Expressionsrate von TASK1 in der Nebenniere in Verbindung mit den oben erwähnten Befunden TASK-ähnlicher Ströme in isolierten Zellen der Zona glomerulosa und deren bekannter „Kaliumempfindlichkeit“ legte die Vermutung einer Beteiligung von TASK1 an der physiologischen Funktion der Zellen der Zona glomerulosa nahe. In der Tat konnten wir gemeinsam mit unseren französischen Kooperationspartnern bei weiblichen TASK1-Knockouttieren einen Hyperaldosteronismus feststellen.
Ausgehend von diesen Vorarbeiten wurden die Auswirkungen des TASK1-Knockouts auf die Kreislaufregulation anhand vergleichender *in vivo* Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen untersucht. Des Weiteren wurde mittels Thermokamera überprüft, ob das Fehlen von TASK1 in der Gefäßmuskulatur zu einer veränderten Extremitätendurchblutung führt.

2.2 Respiration

TASK1-Kanäle sind sowohl in kardio-respiratorischen Hirnstammneuronen als auch in den Glomera carotica exprimiert. In zahlreichen *in vitro* Studien konnte nachgewiesen werden, dass durch Hypoxie oder durch saure pH-Werte der Kaliumstrom gehemmt wird, während durch volatile Anästhetika wie Isofluran eine Aktivierung erfolgt. Basierend auf diesen Erkenntnissen könnte TASK1 sowohl bei der peripheren, als auch bei der zentralen Chemorezeption eine Rolle spielen. Mittels plethysmographischer Messungen an Wildtyp- und TASK1-defizienten Tieren wurde daher untersucht, welche Auswirkungen der Knockout von TASK1 *in vivo* auf die Kontrolle der Atmung hat.

3. Methoden

3.1 Mäuse

Das TASK1-Gen, welches für ein Polypeptid aus 395 Aminosäuren kodiert und zwei Exone aufweist, wurde 1997 aus einer humanen cDNA-Bank geklont (Duprat *et al.*, 1997). Für die Generierung der TASK1-Knockoutmaus wurde das Exon1, welches für den Bereich zwischen der ersten transmembranären Domäne und dem Beginn der ersten porenbildenden Schleife kodiert, ausgeschaltet.

Hierfür wurde von Bill Wisden und Isabel Aller ein Knockoutvektor entwickelt (siehe Abb. 8). Grundsätzlich besteht ein Knockoutvektor aus modifizierter genomischer DNA, welche zur Inaktivierung des Gens führt. Um am Zielort die gewünschte Wirkung zu entfalten, beinhaltete der TASK1-Knockoutvektor Stopp-Codone in allen drei Leserahmen. Als Selektionsmarker für die transfizierten embryonalen Stammzellen diente Neomycin. Per Elektroporation wurde der Knockoutvektor in embryonale Stammzellen eingebracht. In einem Teil der erfolgreich transfizierten embryonalen Stammzellen kam es dann durch homologe Rekombination zum Knockout des TASK1-Gens.

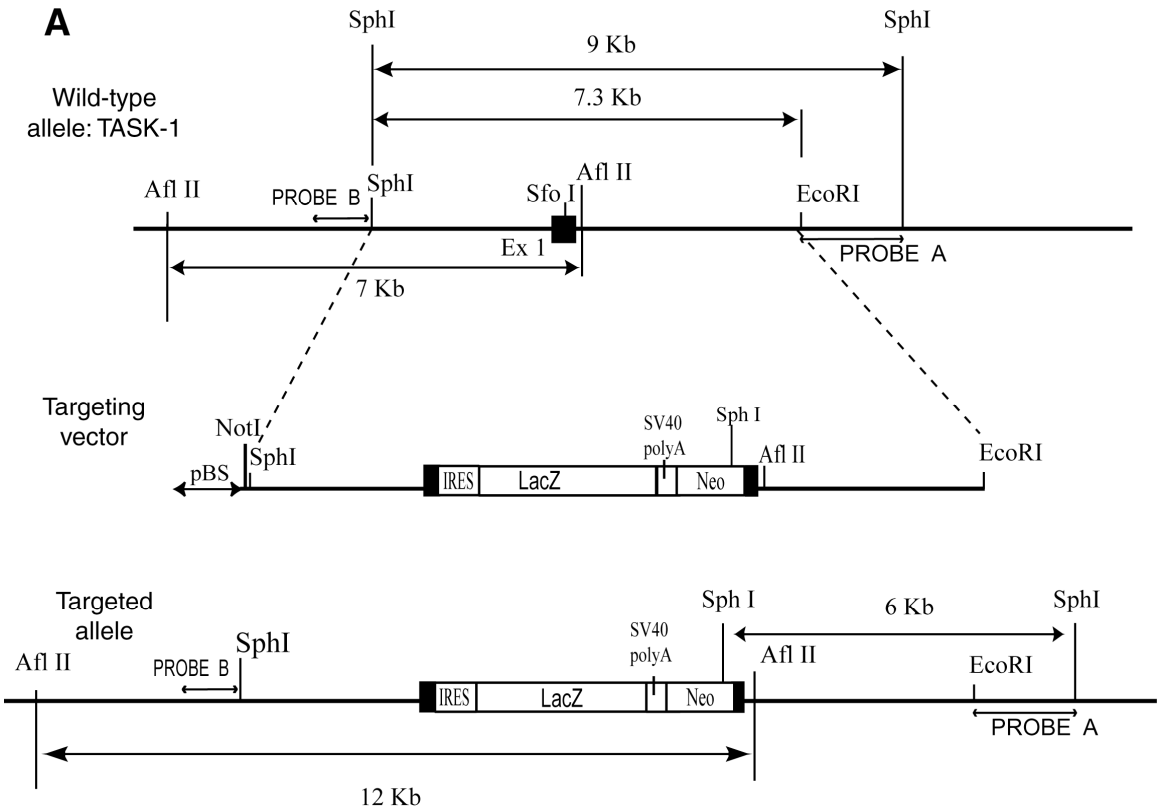

Abb. 8: Gezeigt ist, wie im Wildtypallel (oben) durch homologe Rekombination mit dem Knockoutvektor (Mitte) das Exon1 (schwarze Box) des TASK1-Gens ausgeknockt wird. pBS steht für pBluescript; SV40 polyA für Simian Virus 40 polyadenylation und Neo für Neomycin (Aller *et al.*, 2005).

Einer der so gewonnenen Stammzellklone wurde in Blastozysten injiziert, woraus TASK1-Chimären resultierten. Nach Verpaarung der Chimären mit Wildtypmäusen erhielt man durch Keimbahntransmission heterozygote Mäuse, welche in den genetischen Hintergrund C57BL/6 über sieben Generationen rückgekreuzt wurden (Aller *et al.*, 2005). Durch Heterozgotenverpaarung wurden schließlich homozygote Knockouttiere gewonnen. Sowohl die TASK1$^{-/-}$- als auch die entsprechenden genetisch nicht modifizierten Kontrolltiere (TASK1$^{+/+}$, C57Bl/6J) hatten einen 12 Stunden Hell-Dunkel Rhythmus und erhielten speziesspezifische Standarddiät und Leitungswasser *ad libitum*. TASK1$^{+/+}$- und TASK1$^{-/-}$-Mäuse wurden unter gleichen Bedingungen in offener Tierhaltung gehalten. Die experimentellen Protokolle wurden durch die Regierung der Oberpfalz genehmigt, bevor die Experimente gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt wurden. Zum Zeitpunkt der Versuche hatten die verwendeten Tiere ein Alter von circa 3 Monaten. Als Kontrollgruppe dienten gleich alte Wildtypmäuse, die denselben genetischen Hintergrund besaßen. TASK1-defiziente männliche Mäuse wogen in annähernd allen Serien ca. 10% weniger als Wildtyptiere.

3.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung wurde nur bei den TASK1$^{-/-}$-Tieren durchgeführt.

3.2.1 Präparation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Zur Gewinnung genomischer DNA wurde den TASK1$^{-/-}$-Mäusen eine ca. 3mm lange Gewebeprobe am Schwanz entnommen. Um aus den Schwanzbiopsien genomische DNA zu präparieren, wurden folgende Chemikalien verwendet:

- Proteinase K (100 mg/ml)
- Tail Buffer: bestehend aus 0,1M EDTA, 0,5% SDS, 50mM Tris HCl (pH8) ad 50ml (aliquotieren und bei -20°C lagern)
- Ammoniumacetat 7,5M
- Isopropanol 100%
- Ethanol 70%
- TE-Puffer: bestehend aus 10mM Tris HCl (pH7,5), 1mM EDTA (pH8)

Zu 300µl Tail Buffer versetzt mit 1µl Proteinase K wurde je eine Biopsie gegeben und über Nacht bei 55°C verdaut, bevor dann die Probe für 3min bei 6000rpm zentrifugiert wurde. Proteinase K benötigt man um die Proteine abzubauen, EDTA bindet Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Ionen, die für den Zellzusammenhalt notwendig sind, und SDS löst als Detergens die Lipidmembran auf. Durch diese Behandlung wurden die Zellen aufgebrochen, und es lag eine Suspension vor, in der nun neben den wesentlichen Zellbestandteilen wie Lipiden, Polypeptiden und Kohlenhydraten, auch die genomische DNA frei zugänglich

war. In der Folge wurden nun weitere Aufreinigungsschritte durchgeführt, um die DNA vom Rest zu separieren. Durch Zentrifugation bei 6000rpm wurden dann relativ schwere Bestandteile abgetrennt. Daraufhin wurde der Überstand abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Cup gegeben und mit 100µl Ammoniumacetat gemischt, um die DNA auszufällen. Aus der so aufgereinigten Suspension wurde nun durch Zugabe von 600µl Isopropanol bei -20°C für 20min die genomische DNA präzipitiert. Nach einer 10minütigen Zentrifugationsphase bei 13000rpm wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5-10min bei 13000rpm zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand verworfen und die Ethanolreste wurden mit einer Pipette abgenommen. Nach Trocknung bei Raumtemperatur wurde das Pellet anschließend in 100µl TE-Puffer (pH 7,5) aufgenommen. Nachdem das Pellet bei 55°C für mehrere Stunden im Thermomixer gelöst worden war, wurde der Erfolg der Präparation mittels Gelelektrophorese (1% Agarose-Gel) unter Verwendung von 3µl DNA überprüft.

3.2.2 TASK1 Genotypisierung der Mäuse mittels PCR

Die genetisch veränderten Abschnitte im TASK1-Gen wurden auf der genomischen DNA mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung eines Thermocycler (Tpersonal Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland) nachgewiesen. Hierfür wurde ein Ansatz aus 2µl template DNA, 7,5µl Red Taq Mix 2x von Sigma, Taufkirchen, Deutschland (beinhaltet den PCR-Puffer, $MgCl_2$, dNTPs, Loadingdye und die Taq-Polymerase), je 0,75µl des sense und antisense Primers (Konzentration je 10 µM) und 4µl H_2O verwendet. Die benutzten Oligonukleotide wurden von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland hergestellt. Für das Wildtyp-Allel betrug die Amplikonlänge 300 Basenpaare, wobei der Sense Primer (5´CGTTGGCTCTCATCGTGTGCACC 3´) auf Exon1 und der Antisense Primer (5`CGCGGCGAGTGTAGTTAC 3´) auf Intron1 lag. Der Sense Primer 5´ CCTTCTATCGCCTTCTTCACG 3´ für das TASK1-Knockout-Allel, der sich auf der Neomycin-Kassette befand, und der Antisense Primer 5´ TGATGGCGAAGTAGAAGGAGC 3´ (197), der auf Exon1 war, erzeugten ein 344 Basenpaare langes Amplikon.

Die Proben durchliefen ein standardisiertes PCR-Programm (siehe Abb. 9), wobei die jeweilige Amplikonlänge anschliessend mit Hilfe der Gelelektrophorese nachgewiesen wurde.

Zeit	Temperatur		
3min	94°C	initiale Denaturierung	
30s 30s 20s	94°C 60°C 72°C	Denaturierung Primerbindung Elongation	4 Zyklen
30s 30s 20s	94°C 57°C 72°C	Denaturierung Primerbindung Elongation	36 Zyklen
Beliebig	4°C	bis zur Entnahme der Proben	

Abb. 9: PCR-Programm für die Genotypisierung

3.3 Blutdruckmessung

3.3.1 Messaufbau

Das verwendete Gerät besitzt sechs größenvariable Kammern auf einer Heizplatte, in denen die Mäuse weitgehend immobilisiert waren und gewärmt wurden. An den Schwanz wurde eine Stauungsmanschette angelegt, bevor dieser über einen Lichtsensor platziert und dort fixiert wurde. Weitere Komponenten des Gerätes waren ein Druckgenerator, ein Verstärker und ein Computer für die Datenaufzeichnung.

3.3.2 Messprinzip

Für die Blutdruck- und Pulsmessung bei den Mäusen wurde das nicht invasive sogenannte „tail-cuff“-Messverfahren (TSE Blood Pressure Monitor Non-Invasive-2090002 series, TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland) verwendet. Hierbei wird die Lichttransmission durch den Schwanz der Tiere gemessen, die wesentlich durch den Blutfluss beeinflusst wird. Durch dessen pulsatile Änderung kann zum einen die Herzfrequenz (angegeben in „beats per minute“, bpm) bestimmt und mit Hilfe von Stauungsmanschetten am Schwanz der Tiere der Verschlussdruck der Arterie und damit der systolische Blutdruck gemessen werden. Die Verarbeitung des ausgelesenen elektrischen Signals erfolgte computergestützt mittels der zugehörigen Software.

3.3.3 Durchführung der Messung

Die Mäuse wurden über vier Tage für insgesamt je 4 Stunden an die Messapparatur gewöhnt. Um einen für die Messung ausreichenden Blutfluss im Schwanz zu erzeugen, wurden die Mäuse mindestens fünf Minuten vor Messbeginn in die Messkammern, deren Boden auf 37°C erwärmt worden war, gesetzt. Bevor die Aufzeichnung gestartet wurde, wurde überprüft, ob das Pulssignal detektierbar und ausreichend stabil war. Für jede

Maus wurde die Messung an vier aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Pro Messtag durchlief die Maus 10 Messzyklen im Abstand von jeweils fünf Minuten, die aus je vier Messungen bestanden. Aus den so gewonnenen Daten wurde dann pro Tag der Mittelwert des Blutdrucks und der Herzfrequenz für das individuelle Tier berechnet. Die Validität der Messwerte wurde durch optische Kontrolle des Amplitudenverlaufs verifiziert. Messungen wurden an Wildtyptieren und TASK1-Knockouttieren unter Kontrollbedingungen und nach Blockade des Mineralokortikoidrezeptors mit Canrenoat (Applikation über das Trinkwasser: 1,25g/l Canrenoat plus 10% Saccharose zur Geschmacksverbesserung) durchgeführt. Bei einer normalen Trinkmenge nahm eine Maus so circa 100mg/kg/d an Canrenoat auf. Der Effekt auf den Blutdruck wurde an den letzten 5 Tagen bestimmt. Vor der Canrenoatgabe wurde den gleichen Tieren zur Kontrolle für fünf Tage Trinkwasser mit lediglich 10% Saccharose verabreicht.

3.4 Messung der Hauttemperatur als Maß für die periphere Durchblutung

Die Messung der Hauttemperatur als Maß für die periphere Durchblutung wurde nicht invasiv mittels einer Thermokamera durchgeführt. Hierzu bedienten wir uns dem Prinzip, dass die Oberflächentemperatur des Körpers bei Säugetieren vor allem in peripheren Körperregionen wie dem Schwanz der Tiere bei Indifferenztemperatur von der Durchblutung abhängt. Mit Hilfe einer Thermokamera lässt sich die Wärmestrahlung von Objekten messen und „sichtbar“ machen. Für die Messung wurde je eine $TASK^{+/+}$- und eine $TASK1^{-/-}$-Maus gleichen Geschlechts in einem Standardkäfig platziert, um dann Aufnahmen mit einer Thermokamera (Modell: Varioscan 3021-ST, InfraTec GmbH, Dresden, Deutschland) zu machen. Bei der Durchführung dieser Messungen wurden wir von Prof. Dr. Elsner von der FH-Regensburg unterstützt. Um die Mobilität der Tiere einzuschränken und somit eine bessere Bildqualität zu erreichen, wurden die Tiere mit Isofluran leicht betäubt und dadurch immobilisiert. Für jedes Tier wurden zwei Messserien mit je 6 Fotographien durchgeführt. Anhand einer Referenzskala wurden die Temperaturwerte in der Schwanzmitte abgelesen. Die Analyse erfolgte pseudonymisiert, das heißt, der Untersucher kannte zum Zeitpunkt der Analyse den Genotyp nicht.

3.5 Plethysmographie

3.5.1 Aufbau und Messprinzip

Zur Bestimmung der Atmungsparameter bei den Mäusen wurde ein Ganzkörperplethysmographiesystem (Emka technologies, Paris, Frankreich) mit vier Messkammern, in denen sich die Mäuse frei bewegen konnten, benutzt. Der Messaufbau beinhaltete neben den Kammern mit ihren Sensoren eine Ventilationspumpe, einen

Verstärker und einen PC, in dem die ganzen Daten gespeichert und analysiert wurden (siehe Abb. 10).

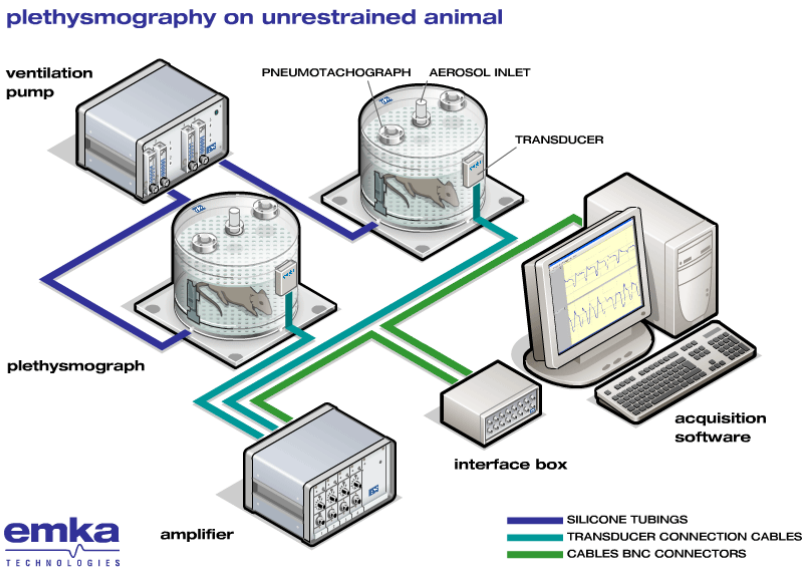

Abb. 10: Versuchsaufbau: Die Mäuse sitzen in kleinen Kammern, in denen sie sich frei bewegen können und Zugang zu Futter und Wasser haben. Über eine Pumpe wird ein variables Gasgemisch (durch Zumischung von O_2, N_2 oder CO_2 zur Raumluft) eingespeist, und die durch die Thoraxexkursionen hervorgerufenen Druckänderungen innerhalb der Kammer werden mittels eines Drucksensors registriert. Die Signale werden über einen Verstärker nach Digitalisierung und Speicherung an die Auswertungssoftware weitergeleitet.

In den kleinen Kammern wurden die Druckänderungen, welche durch die Thoraxbewegungen der Mäuse verursacht wurden, durch Drucksensoren registriert. Nach Verstärkung wurden die Druckschwankungen in digitale Signale umgewandelt, welche mit Hilfe der Iox Software (Emka technologies, Paris, Frankreich) aufgezeichnet wurden. Die Software wurde so konfiguriert, dass für die einzelnen Messgrößen Durchschnittswerte für eine Minute bzw. für 5 Sekunden angegeben wurden. Das kürzere Messintervall wurde benutzt, wenn die betrachteten Zeitperioden kurz waren. Aus der pro Maus detektierten Druck-Volumen-Kurve (siehe Abb. 11) wurden folgende Parameter bestimmt: Inspirations- (Ti) und Expiratonszeit (Te), Peak inspiratory flow (PIF) und Peak expiratory flow (PEF), Ein- und Ausatemvolumen, Tidalvolumen, Atemfrequenz, Relaxationszeit (RT) und die „Enhanced Pause“ (Penh). Das Tidalvolumen (TV) entspricht der Fläche unter Kurve während der Inspirations- (Ti) bzw. der Exspirationszeit (Te). Aus der Frequenz, die der Anzahl der pro Minute durchlaufenen Atemzyklen entspricht (angegeben in „beats per minute“, bpm), und dem Tidalvolumen lässt sich das Minutenvolumen berechnen. Die „Enhanced Pause“ (Penh) ist ein abgeleiteter und durchaus umstrittener Parameter, der durch eine Reihe von Veränderungen beeinflusst wird, z.B. durch veränderte

Atemwegswiderstände (Goldsmith *et al.*, 2002). Er kann durch folgende Formel berechnet werden (Zeldin *et al.*, 2001):

Penh= (Te/RT-1)*(PEF/PIF)

Die Relaxationszeit (RT) ist definiert als die benötigte Zeitspanne, bis das Tidalvolumen in der Ausatmungsphase auf 36% abgesunken ist.

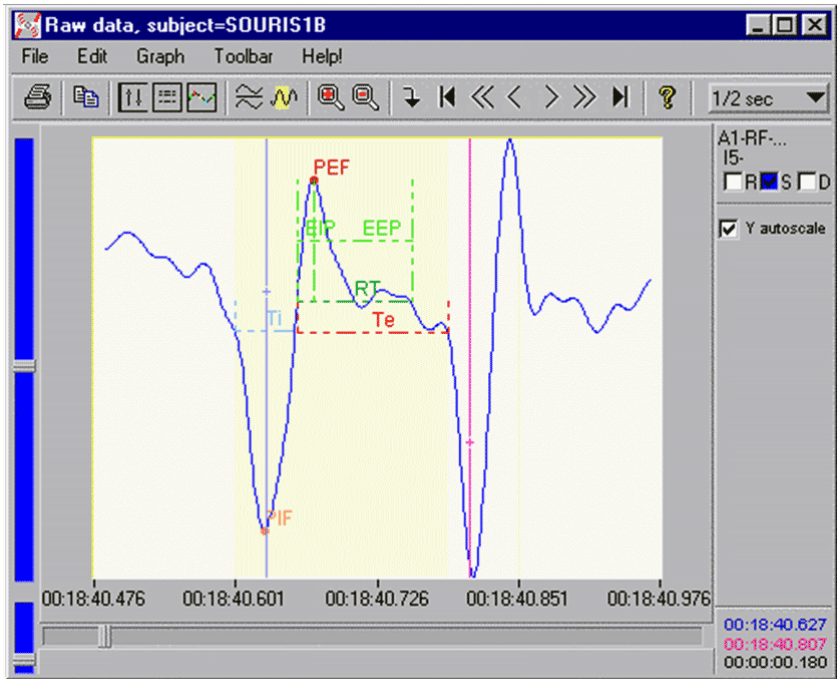

Abb. 11: Atemkurve: Dargestellt ist eine typische Atemkurve, in der die verschiedenen Atmungsparameter aufgetragen sind.

Die aufgezeichneten Volumina und Flüsse, wie z. B. das Tidalvolumen oder der Peak inspiratory flow, wurden auf das Körpergewicht bezogen. Mittels einer Fluss-kontrollierten Pumpe wurde in jeder individuellen Kammer eine Luftzirkulation von 0,4l/min erzeugt, damit es nicht zu einer Akkumulation von CO_2 bzw. zu einem Anstieg der Luftfeuchtigkeit kam. Durch den konstanten und gleichmäßigen Luftfluss wurde eine Interferenz mit dem Atmungsmuster des Versuchstieres vermieden.

3.5.2 Eichung und Messung

Das System wurde an jedem Messtag geeicht, um zu jedem Zeitpunkt vergleichbare Werte zu generieren. Hierzu wurde in jede Kammer ein definiertes Luftvolumen von 1ml mit Hilfe einer Spritze eingeblasen und die Verstärkereinstellungen wurden so gewählt, dass jede Kammer den gleichen Absolutwert anzeigte.

Jede Maus wurde vor der Messung gewogen, und die Kammern wurden abwechselnd mit Wildtyp- und TASK1-Knockouttieren besetzt, um systematische Fehler zu vermeiden. Während der Messung hatten die Mäuse freien Zugang zu Wasser und Futter. Nach einer

initialen Gewöhnungsphase gefolgt von einer Kontrollphase unter Raumluftzufuhr wurde die Reaktion der Tiere auf Veränderungen in der Zusammensetzung der natürlichen Atemgasfraktionen sowie auf Beimischungen durch Inhalationsnarkotika getestet. Die in den Experimenten benötigten Bedingungen, wie z.B. Hypoxie oder Hyerkapnie, wurden durch die variable Mischung von Sauerstoff, Kohlendioxid und Stickstoff erzeugt. Die Zusammensetzung, der in den Plethysmographen zugeführten Luft wurde mit Hilfe eines O_2-Sensors (Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland), der vor der Ventilationspumpe zwischengeschaltet wurde, überprüft. Zur Erzeugung hypoxischer Bedingungen wurde Raumluft mit Stickstoff gemischt. Für Hyperkapnieexperimente wurde CO_2 in der angegebenen Konzentration reinem Sauerstoff zugesetzt. Bei den Messungen mit Isofluran wurde ein Isofluranverdampfer (Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) zur Einstellung der entsprechenden Konzentrationen benutzt.

Die aus Plexiglas bestehenden Messkammern ermöglichten eine Beobachtung der Mäuse während des Experiments. Zusammen mit den kontinuierlich am Bildschirm angezeigten Atmungskurven konnte so für jedes Tier individuell der Versuch beendet werden, bevor es zu einer vitalen Gefährdung kam.

3.6 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben, wobei n für die Anzahl der entsprechenden Experimente steht.

$$SEM = \frac{S_{n-1}}{\sqrt{n}}$$

Mit der Standardabweichung s_{n-1}.

Zur Überprüfung statistisch signifikanter Unterschiede wurden abhängig von den Bedingungen gepaarte oder ungepaarte Student-t-Tests mit einem p-Wert von ≤0,05 verwendet. Signifikanz wird in den Abbildungen mit einem Stern gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen

Wegen der hohen Expressionsrate von TASK1 in der Nebenniere wurde von Dr. Barhanin aus Nizza der Aldosteronspiegel männlicher und weiblicher TASK1-Knockout- und Wildtypmäuse bei hyperkaliämer, normokaliämer und hypokaliämer Diät gemessen. Diese Vorarbeiten zeigten, dass durch das Fehlen von TASK1 die Aldosteronkonzentration im Serum männlicher Tiere nicht beeinflusst wurde. Hingegen wurde im Serum der weiblichen TASK1$^{-/-}$-Mäuse ein um den Faktor 10 erhöhter Aldosteronspiegel detektiert. Dieser primäre Hyperaldosteronismus ließ sich auch durch verschiedene diätetische Bedingungen (Hyper- und Hypokaliämie) nicht beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob es wegen der Hyperaldosteronismus-induzierten Salzretention zu Änderungen des arteriellen Blutdrucks bei TASK1$^{-/-}$-Mäusen kommt (siehe Abb. 12).

Bei den männlichen Tieren führte der Knockout im Vergleich mit den Wildtypmäusen nicht zu einer signifikanten Erhöhung des systolischen Blutdrucks (TASK1$^{-/-}$ n=11; WT n=9; p=0,067). Bei den weiblichen Tieren hingegen zeigte sich ein deutlich unterschiedlicher systolischer Blutdruckwert: Bei den TASK1$^{-/-}$-Mäusen war der systolische Wert um ca. 13mmHg höher als bei den Wildtypmäusen.

Zusätzlich zu der festgestellten Hypertension differierten die Herzfrequenzen zwischen den Genotypen in Abhängigkeit vom Geschlecht. Die Zahl der pro Minute detektierten Pulsschläge der männlichen Mäuse unterschied sich nicht signifikant (TASK1$^{-/-}$n=11; WT n=9; p=0,11), wohingegen es beim weiblichen Geschlecht durch den Knockout zu einer signifikanten Verringerung der Pulsfrequenz kam. Dieses Ergebnis legt also den Schluss nahe, dass es nicht aufgrund eines gesteigerten Sympathikotonus zu erhöhten Blutdruckwerten gekommen war.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der kausale Zusammenhang zwischen der Hypertension und dem Hyperaldosteronismus der weiblichen Tiere mittels der Gabe des Aldosteronrezeptorblockers Canrenoat weiter untersucht. Unter Kontrollbedingungen hatten die weiblichen TASK1$^{-/-}$-Mäuse in dieser Messreihe erneut erhöhte systolische Blutdruckwerte. Danach wurde für insgesamt 10 Tage dem Trinkwasser Canrenoat (1,25g/l) beigemengt, wobei an den letzten 5 Tagen der Blutdruck bestimmt wurde. Die medikamentöse Blockade des Aldosteronrezeptors führte nur bei den weiblichen Knockout-Mäusen zu einem Absinken des Blutdrucks (siehe Abb. 12). Es wurde letztlich der Blutdruckunterschied zwischen den Genotypen aufgehoben. Die Differenz hinsichtlich der Herzfrequenz bestand hingegen unter Canrenoat fort (WT 673±7,82bpm, n=6; TASK1$^{-/-}$ 547±10,1bpm, n=6; p=0,000003). Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass der bei den weiblichen Knockouttieren beobachtete Hyperaldosteronismus durch

sekundäre Expansion des Extrazellulärvolumens pathophysiologisch relevant und kausal für die hypertensiven Blutdruckwerte der Tiere ist.

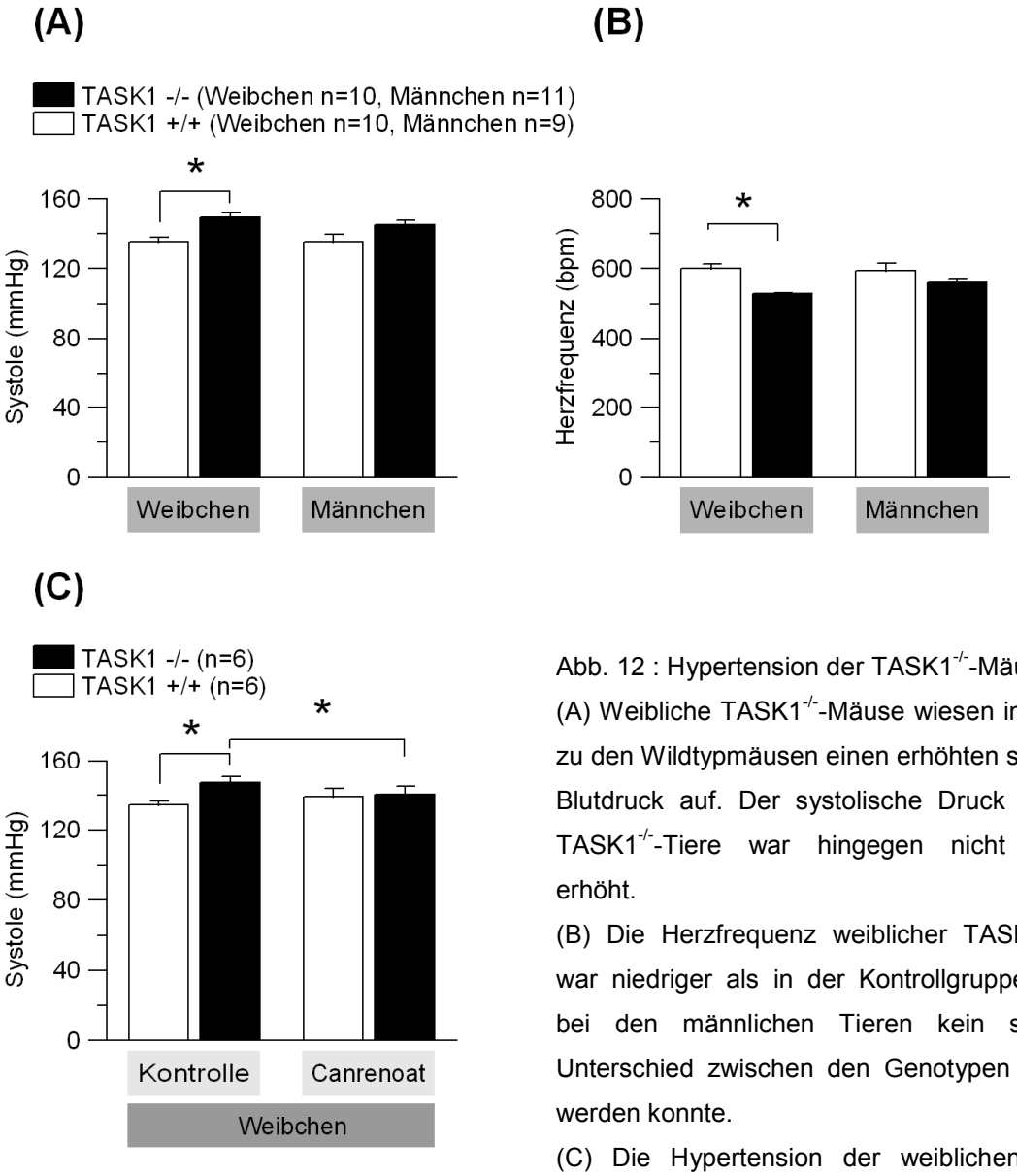

Abb. 12 : Hypertension der TASK1$^{-/-}$-Mäuse:
(A) Weibliche TASK1$^{-/-}$-Mäuse wiesen im Vergleich zu den Wildtypmäusen einen erhöhten systolischen Blutdruck auf. Der systolische Druck männlicher TASK1$^{-/-}$-Tiere war hingegen nicht signifikant erhöht.
(B) Die Herzfrequenz weiblicher TASK1$^{-/-}$-Mäuse war niedriger als in der Kontrollgruppe, während bei den männlichen Tieren kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden konnte.
(C) Die Hypertension der weiblichen TASK1$^{-/-}$-Mäuse verschwand durch die Blockade des Mineralokortikoidrezeptors mit Canrenoat.

4.2 Thermokamera-Untersuchung von Wildtyp- und TASK1$^{-/-}$-Mäusen

Laut Unigene Database ist der TASK1-Kanal in arteriellen Gefäßen exprimiert (siehe oben) und könnte so an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt sein. Diese Vermutung wird dadurch erhärtet, dass TASK1 in Pulmonalarterienmuskelzellen an der Einstellung des Ruhemembranpotentials beteiligt ist, und ein Fehlen von TASK1 müsste demnach wie hypoxische Bedingungen zu einer Vasokonstriktion führen (Gurney *et al.*, 2003).

Im Rahmen der Blutdruckmessung war auffällig, dass bei den Knockouttieren die Registrierung der Pulskurve am Schwanz schwieriger war als bei den Wildtypmäusen. Dieser Befund wurde dadurch erhärtet, dass die Success-rate bei den Blutdruckmessungen in der Knockoutgruppe geringer war (TASK1$^{-/-}$ 1586/3360=47,2%, n=21; WT 1958/3040=64,4%, n=19; p=0,0004). Weiterhin war es subjektiv bei den Wildtypen deutlich leichter, Blut aus der Schwanzarterie abzunehmen.

Diese Befunde legten die Vermutung nahe, dass die TASK1$^{-/-}$-Tiere einen erhöhten arteriellen Gefäßtonus haben könnten.

Wir haben daher mit Hilfe einer Thermokamera untersucht, ob bei den TASK1$^{-/-}$-Mäusen eine Erhöhung des arteriellen Gefäßtonus zu einer peripheren Minderdurchblutung führt, welche sich in einer veränderten Hauttemperatur äußert. Es war zu erwarten, dass bei herabgesetzter Durchblutung die Temperatur des unbehaarten Mäuseschwanzes erniedrigt ist. Bei der Auswertung der Temperatur an der Schwanzmitte konnte jedoch kein Unterschied zwischen den TASK1$^{-/-}$- und den Wildtyp-Tieren festgestellt werden (siehe Abb. 13).

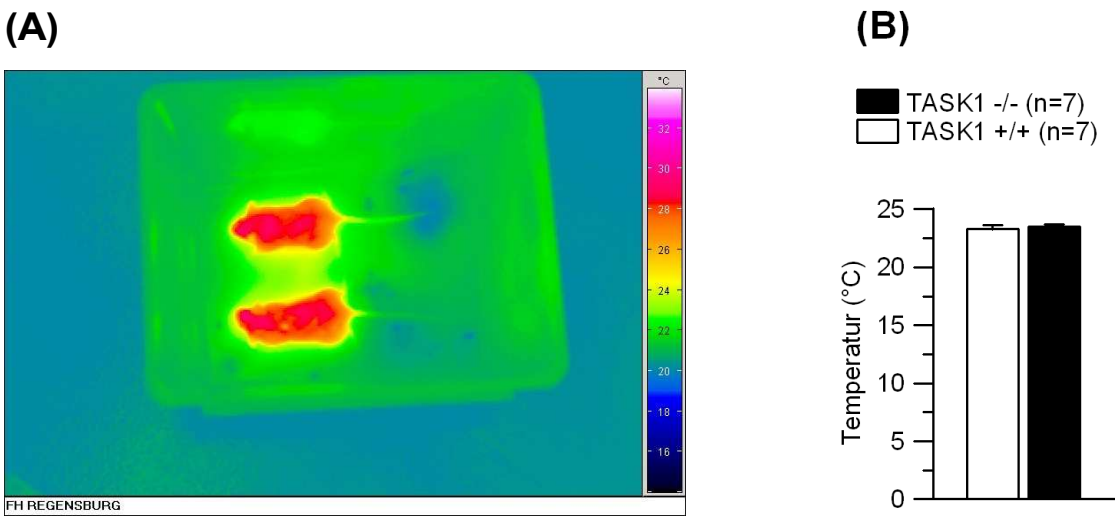

Abb. 13: Thermokamera: (A) Bildbeispiel von je einer Wildtyp- und TASK1$^{-/-}$- Maus. (B) Die Messung der Temperatur an der Schwanzmitte differierte zwischen den Genotypen nicht.

4.3 Respiration

Bisher durchgeführte *in vitro* Untersuchungen deuten daraufhin, dass 2-P-Domänen-Kanäle sowohl für die zentrale als auch für die periphere Atmungsregulation wichtig sind (Buckler *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2002). Die Bedeutung des TASK1-Kanals für den respiratorischen Phänotyp *in vivo* wurde in der vorliegenden Arbeit durch plethysmographische Messungen an Mäusen untersucht. Hierfür wurden Wildtyp- und die entsprechenden nach Alter und Geschlecht gematchten TASK1-Knockouttiere verwendet.

4.3.1 Abnehmende Sauerstoffkonzentration als Atemstimulus

Durch die stufenweise Reduktion des O_2-Gehalts in der Inspirationsluft konnte überprüft werden, ob sich durch das Fehlen des TASK1-Kanals Unterschiede bezüglich der Atemantwort auf Hypoxie im Vergleich zu Wildtypmäusen ergeben. Nach einer Eingewöhnungsphase (ca. 30-60 min) und dem Aufzeichnen der Kontrollphase (30min) wurde der Sauerstoffgehalt durch Beimengung von Stickstoff alle 30 Minuten abgesenkt. Die Atmungsparameter wurden bei folgenden Sauerstoffkonzentrationen aufgezeichnet: 21% O_2, 15% O_2, 12% O_2, 9% O_2 und 7% O_2. Durch die stufenweise Reduktion des O_2-Gehaltes kommt es nur zu einem leichten physiologischen Anstieg der alveolären Ventilation (Stimulation der Atmung hauptsächlich über periphere Chemorezeptoren), bevor dann bei höhergradiger Hypoxie (ca. ab 9% O_2) eine Atemdepression (so genannte „hypoxic depression“) auftritt. In der Nachkontrolle bei Raumluft wird wieder das Ausgangsniveau erreicht.

4.3.1.1 Stufenhypoxie - weibliche Mäuse

Hypoxie führte genotypunabhängig zu Veränderungen der Minutenvolumina, Tidalvolumina und Atemfrequenzen

Wie man in Abbildung 14 sieht, wurden die wichtigsten Atmungsparameter unter Kontrollbedingungen und unter Hypoxie bei den weiblichen Mäusen nicht vom Genotyp beeinflusst. Das Tidalvolumen, die Atemfrequenz und das daraus errechnete Minutenvolumen waren bei TASK1$^{-/-}$- und TASK1$^{+/+}$-Tieren annähernd identisch.

Im Vergleich zur Kontrollphase war das Minutenvolumen bei den weiblichen Wildtypmäusen ab einem Sauerstoffgehalt von 9% erniedrigt und erreichte dann bei der 7% Hypoxie die tiefsten Werte. Ein von der Tendenz her ähnlicher Verlauf ließ sich bei den Knockoutmäusen beobachten, womit unter Hypoxie die Werte in der TASK1$^{-/-}$- nicht von der Kontrollgruppe abwichen.

Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich beim Tidalvolumen. Bei der Frequenz blieb die Erhöhung bei den ersten Hypoxiestufen aus und sie fiel bei beiden Genotypen von der ersten Hypoxiestufe kontinuierlich bis zur letzten Hypoxiestufe ab. In der Nachkontrolle stieg die Frequenz beider Genotypen wieder auf das Ausgangsniveau an.

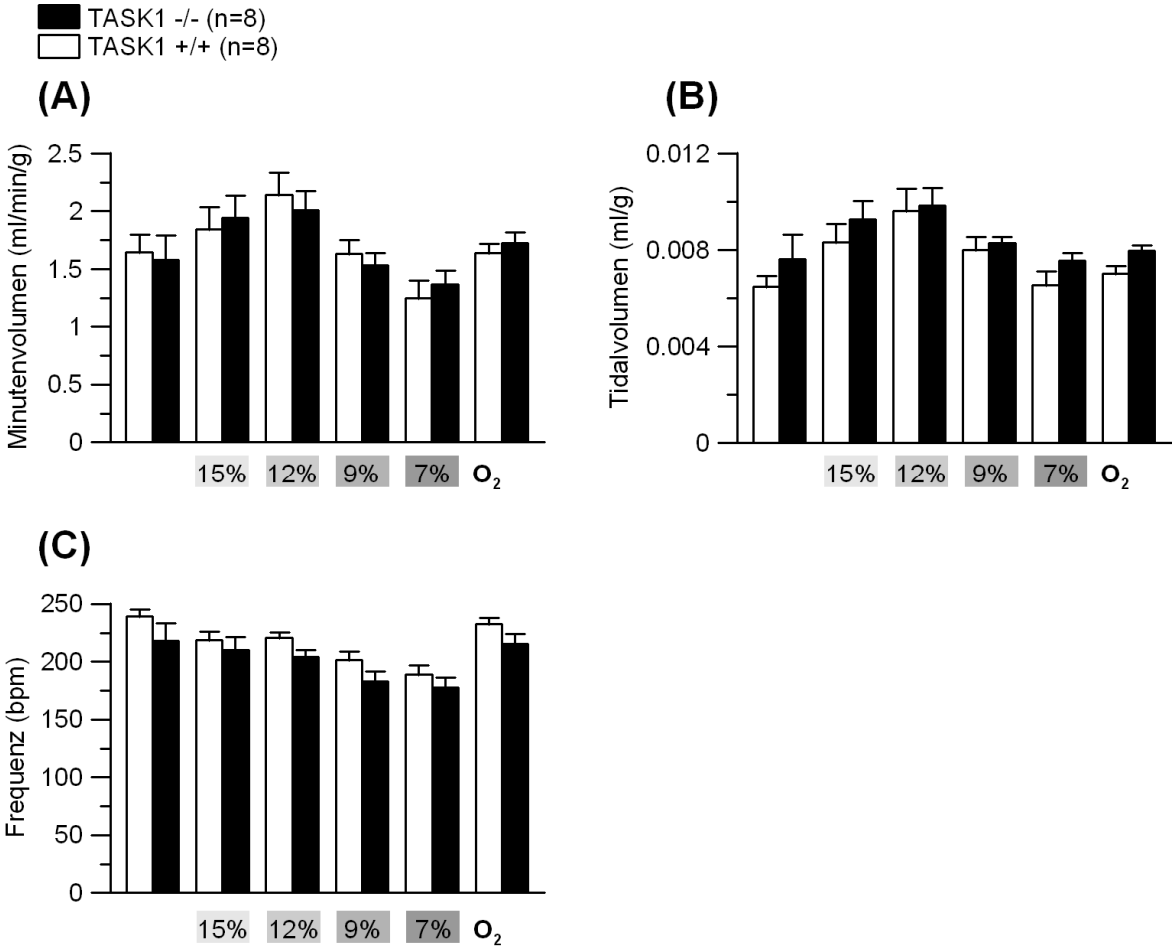

Abb. 14: Stufenhypoxie Weibchen: Während des gesamten Experiments unterschieden sich die beiden Genotypen nicht hinsichtlich des Minutenvolumens (A), des Tidalvolumens (B) und der Atemfrequenz (C).

Die TASK1$^{-/-}$-Mäuse wiesen eine längere Relaxationszeit bzw. eine verkürzte „Enhanced Pause“ auf

Abbildung 15 zeigt, dass die Relaxationszeit, die definiert ist als die Zeitspanne bis das Tidalvolumen während der Ausatmungsphase auf 36% des Maximalwertes abgesunken ist, durchgehend bei den TASK1$^{-/-}$-Mäusen länger war als in der Vergleichsgruppe. Nach einem leichten Zuwachs unter 15% O_2 blieb die Relaxationszeit ab der Messperiode mit 9% O_2 auf einem konstant niedrigeren Level, das auch in der Nachkontrolle bestehen blieb.

Die „Enhanced Pause“ (Penh) setzt sich aus Peak inspiratory flow (PIF), Peak expiratory flow (PEF), der Exspirations- (Te) und der Relaxationszeit (RT) zusammen (s.o.). Der Peak inspiratory flow bzw. der Peak expiratory flow wichen genau wie die Ausatemzeit über das komplette Experiment nicht signifikant voneinander ab. Hingegen war die Relaxationszeit ohne TASK1 von Anfang bis zum Ende verlängert.

Der alleinige Unterschied bei der Relaxationszeit führte bei einem Sauerstoffgehalt von 21% noch zu keiner signifikanten Abweichung hinsichtlich der "Enhanced Pause" (Penh).

Die Penh stieg in beiden Gruppen mit zunehmender Hypoxie unterschiedlich stark an und erreichte in der Nachkontrollphase nicht mehr das Ausgangsniveau. Durch die Berechnung mittels obengenannter Formel basiert die Penh-Differenz wohl nicht nur auf der Abweichung bei der Relaxationszeit. Vielmehr wird dieser Effekt durch leicht unterschiedliche Verläufe bei den übrigen Parametern (PIF, PEF, Te) potenziert. Vorsichtig interpretiert weist die Penh darauf hin, dass es Unterschiede im Atmungsmuster der beiden Genotypen gibt. Welcher Natur diese Unterschiede sind und welchen Beitrag Atemwegsparameter dabei haben, lässt sich mit den vorliegenden Daten allein noch nicht sagen.

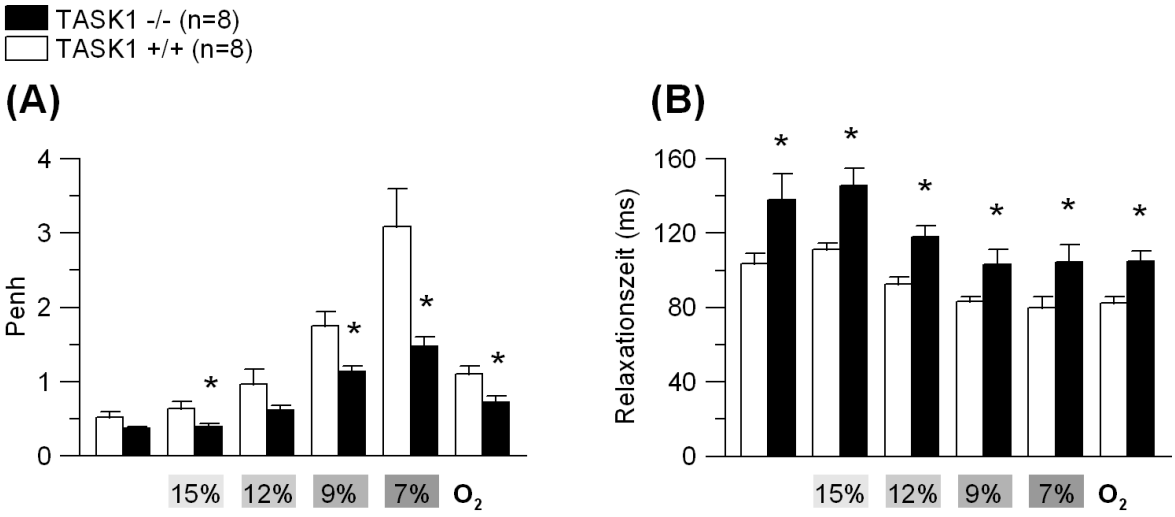

Abb. 15: Stufenhypoxie Weibchen: (A-B) Die „Enhanced Pause“ (Penh) war bei den Wildtypen großteils verlängert, was wesentlich auf einer längeren Relaxationszeit ohne TASK1 beruhte.

4.3.1.2 Stufenhypoxie - männliche Mäuse

Durch den TASK1-Knockout kam es zur Mehratmung

Aus Abbildung 16 geht hervor, dass bereits unter Kontrollbedingungen bei den TASK1$^{-/-}$-Mäusen ein erhöhtes Minutenvolumen vorlag. Durch den fast parallelen Verlauf während der einzelnen Hypoxiestufen blieb die Differenz hinsichtlich des Minutenvolumens zwischen den zwei Genotypen bestehen. Auch hier sieht man angedeutet die physiologische Antwortkurve auf die Hypoxie, die oben beschrieben ist. In den beiden letzten Hypoxiestufen konnte beim gesamten Kollektiv ein kontinuierlicher Abfall des Minutenvolumens beobachtet werden.

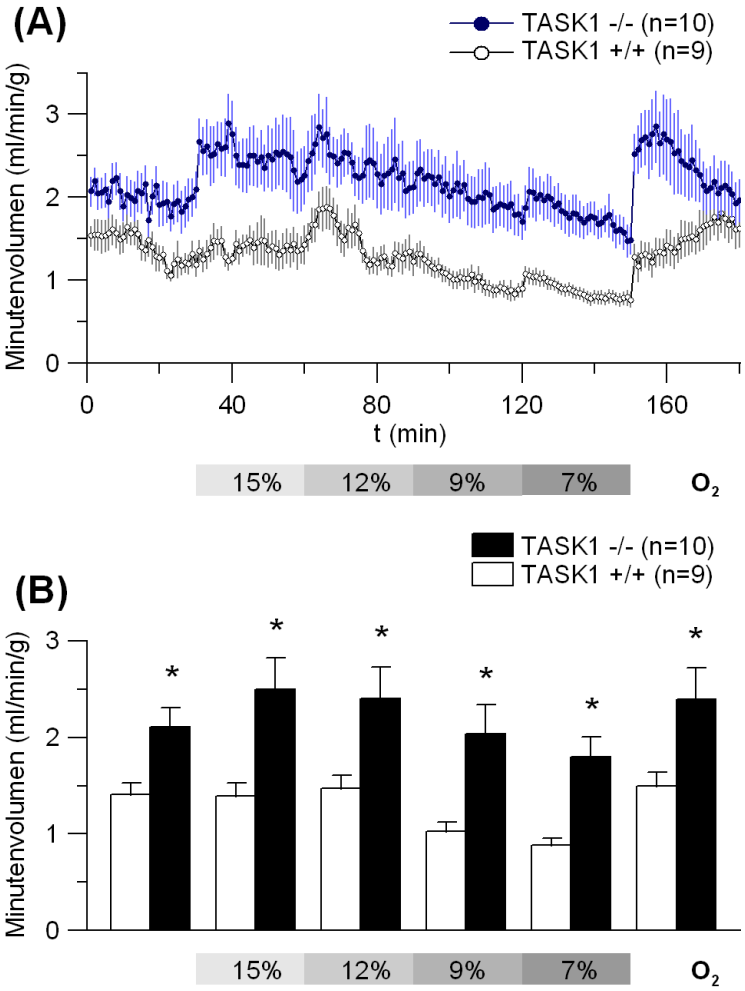

Abb. 16: Minutenvolumen von Männchen bei Stufenhypoxie, (A) zeitlicher Verlauf, (B) Zusammenfassung. Unter Kontrollbedingungen und bei Reduktion des O_2-Gehaltes in der Einatemluft wiesen die TASK1$^{-/-}$-Mäuse ein erhöhtes Minutenvolumen auf.

Für die Mehratmung spielt bei näherer Analyse das Tidalvolumen die zentrale Rolle, welches in Abbildung 17 aufgetragen ist. Unter Normoxie und Hypoxie war das Tidalvolumen bei männlichen TASK1$^{-/-}$-Tieren größer. Hierzu passt auch, dass die Atemwegsflüsse in der Inspiration (PIF) bzw. in der Exspiration (PEF) differierten.

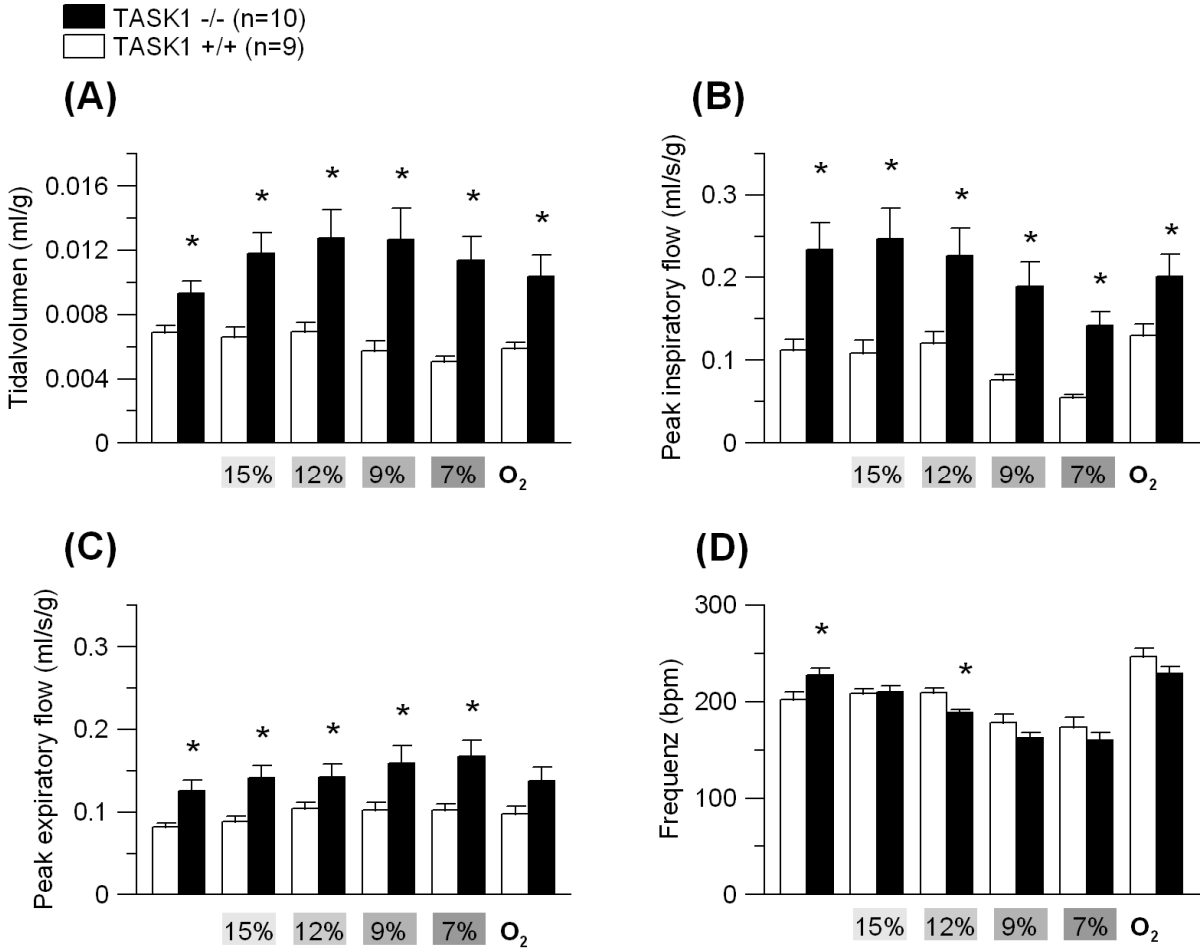

Abb. 17: Tidalvolumen, PIF, PEF, Frequenz von Männchen bei Stufenhypoxie: (A) Das Tidalvolumen war bei TASK1$^{-/-}$-Mäusen sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie erhöht. Besonders der Spitzenfluss bei der Einatmung (Peak inspiratory flow) war in der Knockoutgruppe erhöht (B), in geringerem Maß auch der Spitzenfluss bei der Ausatmung (Peak expiratory flow) (C). Die Atemfrequenz in der Wildttyp- bzw. der TASK1$^{-/-}$-Gruppe war großteils identisch (D).

Betrachtet man die Atemfrequenz, zeigten sich keine hypoxiebedingten Unterschiede bei beiden Gruppen. Die Atmung der Knockoutmäuse war unter Kontrollbedingungen beschleunigt, was sich vermutlich am besten mit einer vermehrten Unruhe der TASK1$^{-/-}$-Mäuse erklären lässt. Obwohl zumindest unter Normoxie dadurch die Mehratmung verursacht sein kann, basiert das gesteigerte Minutenvolumen wohl eher auf dem erhöhten Tidalvolumen. Denn im weiteren Verlauf der Messung unterschied sich die Atemfrequenz nicht wesentlich, wenn überhaupt atmeten die TASK1$^{-/-}$-Mäuse unter 12% O_2 langsamer (aber vertieft).

Die TASK1$^{-/-}$-Mäuse wiesen eine längere Relaxationszeit bzw. eine verkürzte "Enhanced Pause" auf

Über die komplette Messung hinweg wurde bei den Knockouttieren eine prolongierte Relaxationszeit detektiert. Betrachtet man den Verlauf der Relaxationszeit in Abbildung 18, fällt auf, dass diese bei den TASK1$^{+/+}$-Mäusen kontinuierlich abnahm und die Minimalwerte in der Nachkontrolle vorlagen. Bei den TASK1$^{-/-}$-Tieren hingegen führte leichte Hypoxie zu einem Anstieg der Relaxationszeit.

Die "Enhanced Pause", die sich aus den Atemwegsflüssen, der Exspirations- und der Relaxationszeit zusammensetzt, nahm in beiden Gruppen unter Hypoxie stark zu und erreichte das höchste Niveau unter 7% O_2. Außerdem lagen die Penh-Werte der TASK1$^{-/-}$-Tiere das ganze Experiment hindurch unter dem Niveau der Wildtypmäuse.

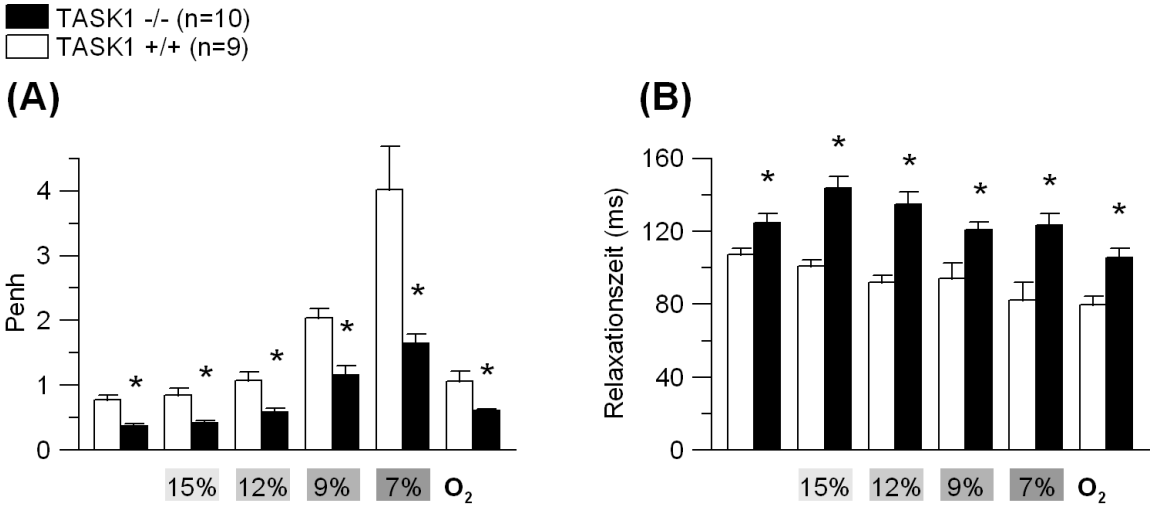

Abb. 18: Penh und Relaxationszeit bei Männchen unter Stufenhypoxie: Durch den Knockout verringerte sich die „Enhanced Pause“ (Penh) (A) über alle Messperioden hinweg, während die Relaxationszeit (B) das umgekehrte Bild bot.

4.3.2 Hyperkapnie

Eine Erhöhung der arteriellen CO_2-Konzentration führt zu einer starken Stimulation des Atemantriebs, indem periphere und zentrale im Hirnstamm gelegene Chemorezeptoren kardio-respiratorische Neuronengruppen aktivieren. Die genaue Lokalisation der zentralen Chemorezeptoren sowie die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen der CO_2-Sensitivität sind noch nicht genau bekannt und Gegenstand aktueller Forschung. *In vitro* Studien weisen darauf hin, dass TASK1 aufgrund seiner pH-Empfindlichkeit und Lokalisation am CO_2-„sensing“ beteiligt sein könnte. Durch die Erhöhung der CO_2-Konzentration auf 5% in der Einatemluft sollte nun am Mausmodell untersucht werden, wie sich das Fehlen von TASK1 auf die Atmungsregulation auswirkt. Das Experiment wurde sowohl mit weiblichen als auch mit männlichen Tieren durchgeführt.

4.3.2.1 Hyperkapnie - weibliche Mäuse

Kein Unterschied zwischen den Genotypen beim Minuten-, Tidalvolumen und der Frequenz

In der Normoxiephase zu Beginn des Experiments verhielten sich die Atmungsparameter aller weiblichen Mäuse wie bei der Durchführung der Stufenhypoxie. Wie aus Abbildung 19 hervorgeht, unterschieden sich das Minuten-, das Tidalvolumen und die Frequenz zwischen den Genotypen nicht.

Durch die Hyperkapnie (5% CO_2) verdoppelte sich das Minutenvolumen in beiden Gruppen, was einherging mit einer ebenfalls signifikanten Stimulation des Tidalvolumens und der Frequenz. In der Nachkontrolle normalisierten sich die Atmungsparameter dann wieder.

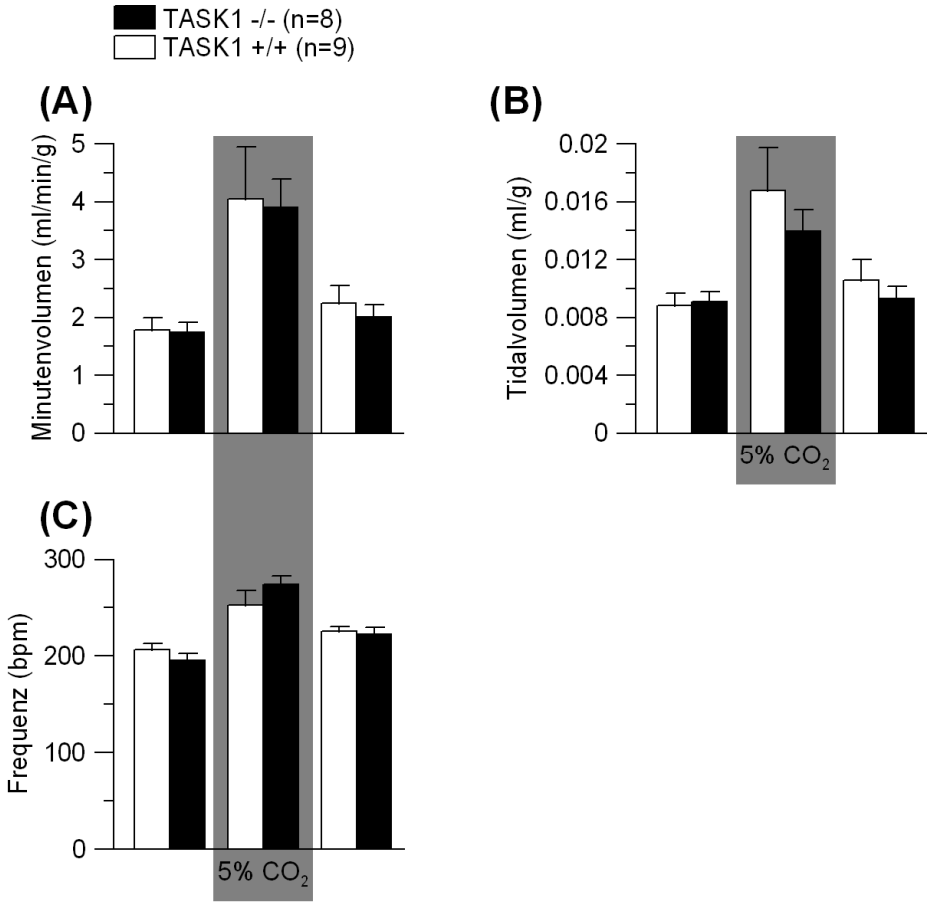

Abb. 19: Hyperkapnie Weibchen: (A-C) Als Reaktion auf die Hyperkapnie stieg das Minutenvolumen, das Tidalvolumen und die Frequenz bei beiden Genotypen in gleicher Weise an.

Die Differenz bei der Relaxationszeit verschwand unter Hyperkapnie

Wie in Abbildung 20 und oben bereits gezeigt, war auch hier die Relaxationszeit der TASK1$^{-/-}$-Mäuse in der Vorkontrolle unter Normoxie höher. Dies war verbunden mit einem niedrigeren „Enhanced Pause“-Wert der TASK1$^{-/-}$-Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Der Unterschied, welcher unter Normoxie zwischen den Genotypen hinsichtlich der Relaxationszeit und der „Enhanced Pause“ (Penh) bestand, verschwand während der Hyperkapnie. Die Relaxationszeit der Wildtypmäuse nahm weniger stark ab und pendelte sich auf dem Level der TASK1$^{-/-}$-Mäuse ein, bevor sich in der Nachkontrolle mit ansteigender Relaxationszeit tendenziell wieder ein Unterschied entwickelte. Durch die bei der Berechnung im Nenner stehende Relaxationszeit verhielt sich die „Enhanced Pause“ genau umgekehrt. Die „Enhanced Pause“ der Knockoutmäuse verdoppelte sich in der 5% CO_2-Periode, während sie bei den Wildtyptieren nur um knapp 50% anstieg. Dies resultierte in beinahe identischen Penh-Werten, was sich in der Nachkontrolle nicht änderte.

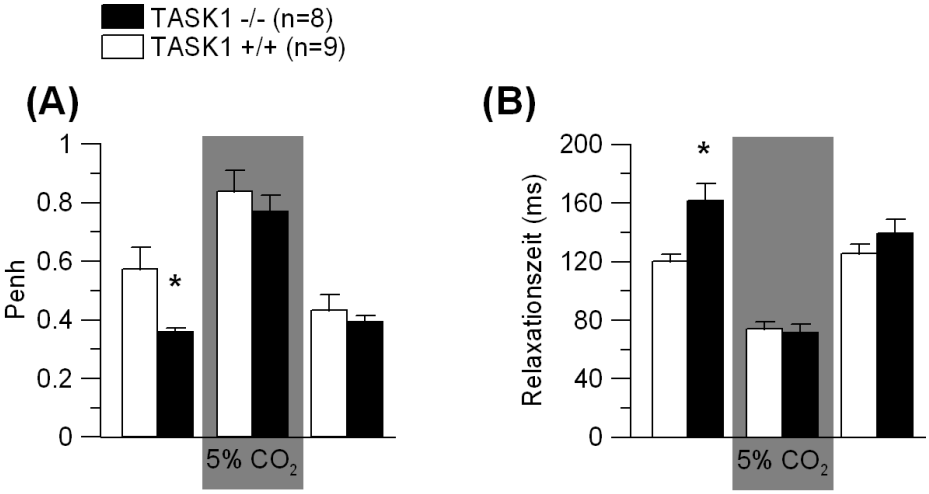

Abb. 20: Penh und Relaxationszeit von Weibchen während Hyperkapnie: (A) Die TASK1$^{-/-}$-Mäuse wiesen nur in der Vorkontrolle eine kürzere Penh auf. (B) Die Relaxationszeit hingegen war bei den TASK1$^{-/-}$-Mäusen in der Vorkontrolle länger.

4.3.2.2 Hyperkapnie - männliche Mäuse

TASK1$^{-/-}$-Mäuse atmeten unter Hyperkapnie und in der Nachkontrolle mehr

Das Minutenvolumen- bzw. das Tidalvolumen männlicher Wildtyp- und jenes der TASK1$^{-/-}$-Mäuse war in dieser Serie in der Vorkontrolle weitestgehend gleich (siehe Abb. 21). Weiterhin bewegte sich die Ruhefrequenz der beiden Genotypen auf einem identischen Niveau.

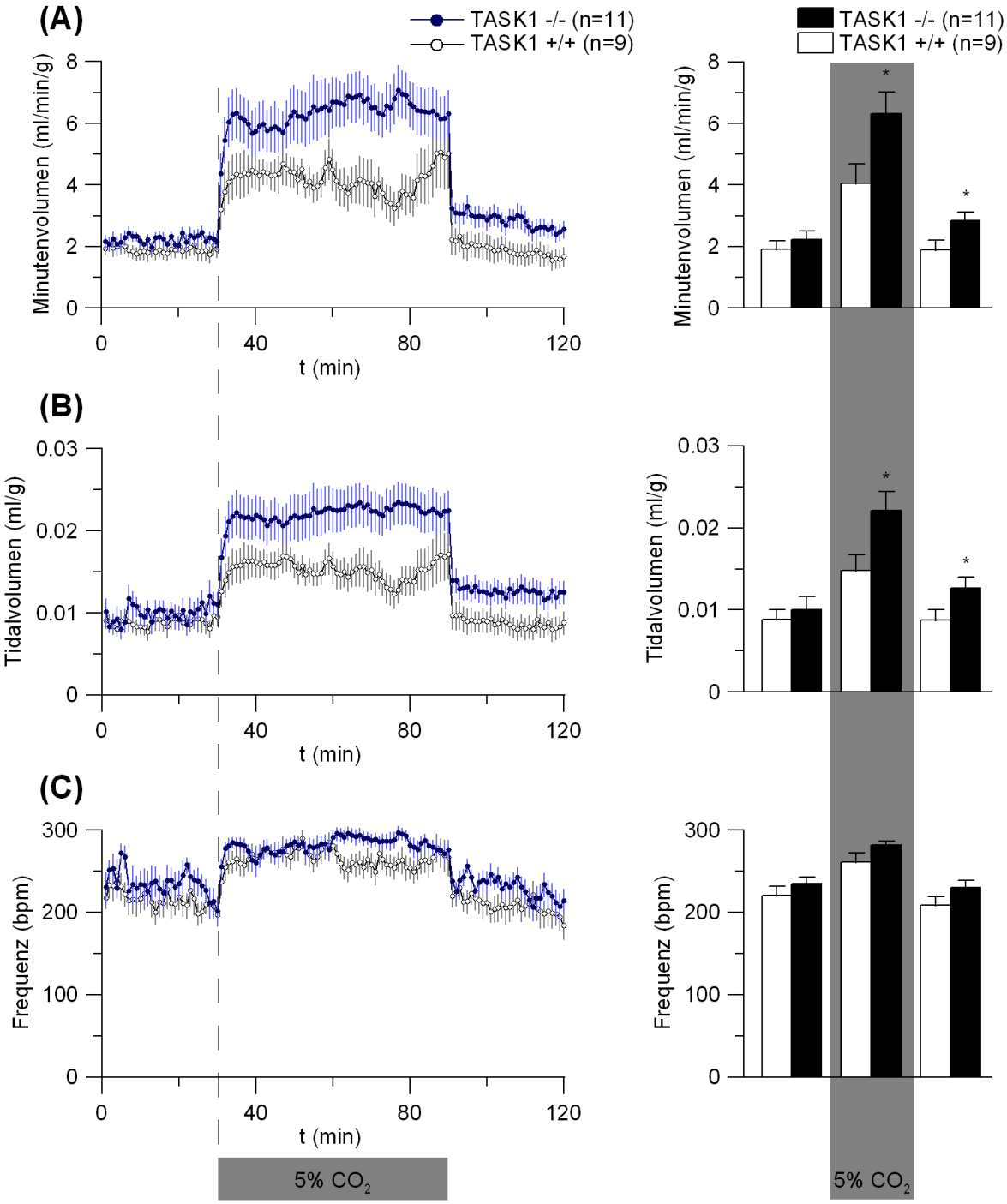

Abb. 21: Minutenvolumen, Tidalvolumen, Frequenz bei Männchen unter Hyperkapnie: Links ist jeweils der zeitliche Verlauf, rechts die Zusammenfassung dargestellt. Das Minutenvolumen (A) und das Tidalvolumen (B) nahmen unter Hyperkapnie bei TASK1-Knockouttieren stärker zu, der Frequenzanstieg (C) war zwischen den Genotypen nicht verschieden.

CO_2 führte genotypabhängig zu unterschiedlich starken Änderungen der Atmungsparameter der männlichen Mäuse. Das Minutenvolumen der Wildtyptiere verdoppelte sich, mit einem Anstieg um ca. 150% war dieser Effekt in der TASK1$^{-/-}$-Gruppe noch ausgeprägter. Parallel dazu nahm das Tidalvolumen bei den Wildtypmäusen und bei den TASK1$^{-/-}$-Tieren unterschiedlich stark zu. Die Zunahme des Tidalvolumens

beruhte auf den unter Normoxie und Hyperkapnie erhöhten maximalen Atemwegsflüssen (PIF und PEF), welche unter Hyperkapnie ebenfalls stark anwuchsen (siehe Abb. 22). Die Atemfrequenz erhöhte sich in der TASK1-Knockout- und in der Kontrollgruppe um mehr als 20%. Dies wurde in Abbildung 23 exemplarisch an je einer Wildtyp- und TASK1$^{-/-}$-Maus dargestellt.

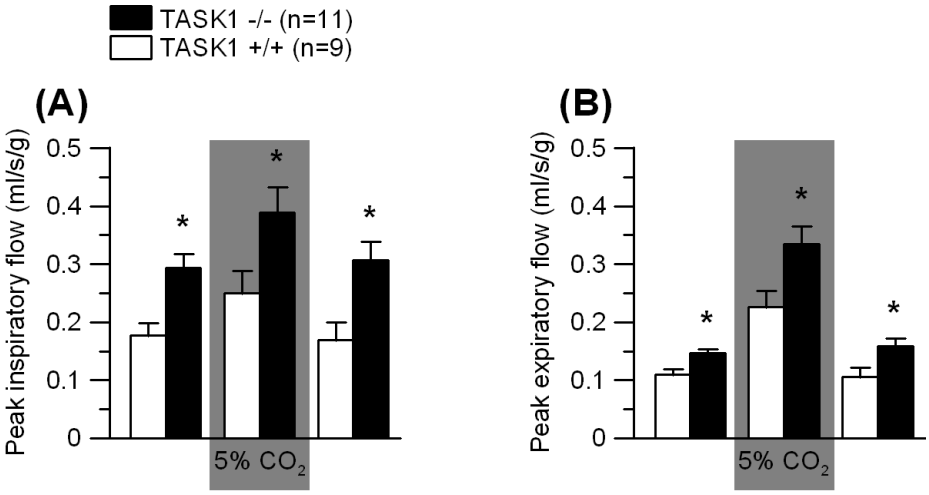

Abb. 22: PIF und PEF bei Männchen unter Hyperkapnie: (A-B) Bei Raumluft waren die maximalen inspiratorischen (A) und exspiratorischen (B) Flüsse der TASK1$^{-/-}$-Mäuse bereits vergrößert, unter Hyperkapnie verstärkte sich dieses Phänomen.

In der Nachkontrollphase stellte sich für die verschiedenen Atmungsparameter annähernd wieder das Ausgangsniveau ein. Jedoch blieben die unter Hyperkapnie aufgetretenen Abweichungen hinsichtlich des Tidal- bzw. des Minutenvolumens zwischen den Genotypen bestehen.

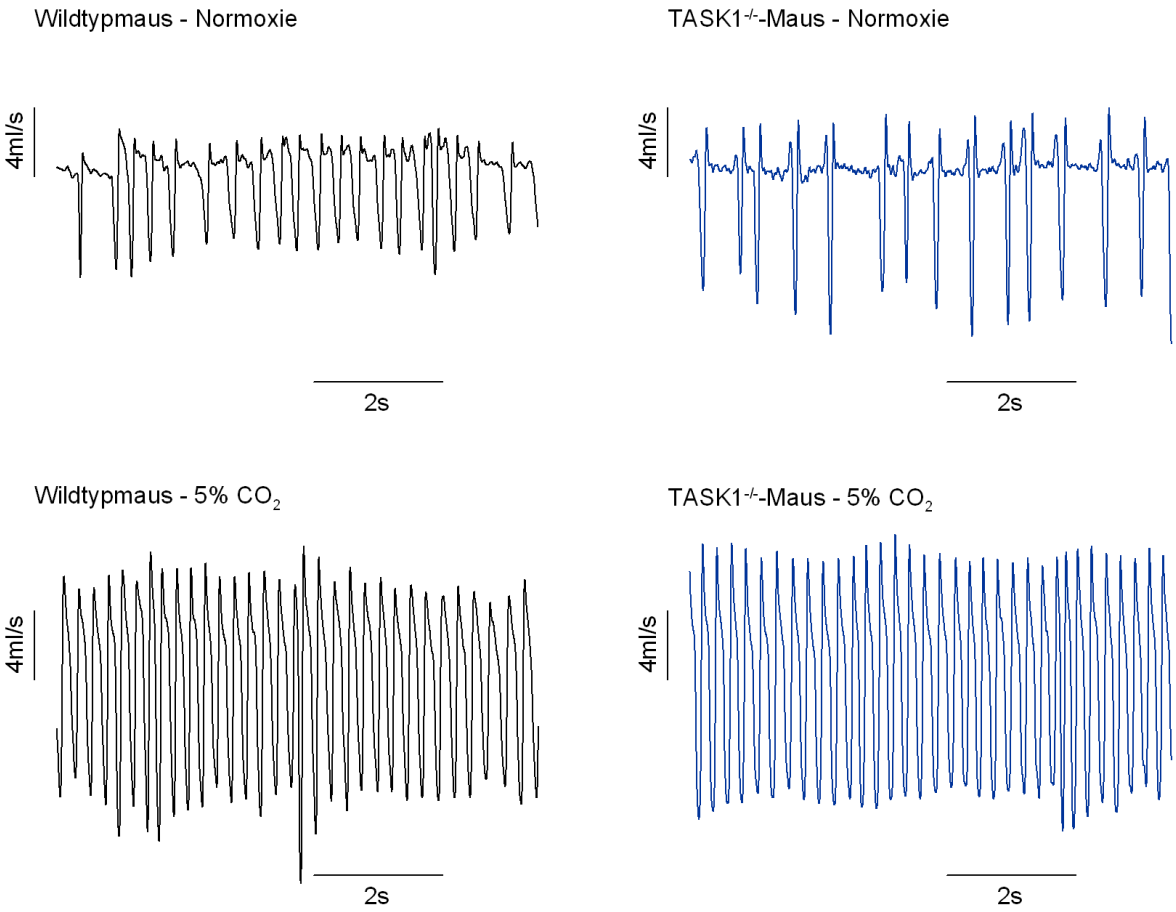

Abb. 23: Originalkurven der Atemstromstärken von zwei Männchen unter Hyperkapnie: Unter 5% CO_2 beschleunigte und vertiefte sich die Atmung der Wildtyp- bzw. der TASK1$^{-/-}$-Mäuse.

Hyperkapnie führt zur Angleichung der Relaxationszeit und der Penh zwischen den Genotpyen

Bei Raumluft war die Relaxationszeit der Wildtypen kürzer als die der TASK1$^{-/-}$-Mäuse. Umgekehrt war die „Enhanced Pause“ (Penh) bei den Wildtyptieren prolongiert. Wie bei den weiblichen Tieren war der Unterschied hinsichtlich der Relaxationszeit und der Penh unter Hyperkapnie nicht mehr nachweisbar (siehe Abb. 24). Dies könnte durch eine Hemmung von TASK1 bei den Wildtyptieren durch CO_2 verursacht sein, sodass unter dieser Bedingung beide Genotypen keinen funktionierenden TASK1-Strom aufweisen. Nach Beendigung der Hyperkapnie erreichten die Relaxationszeiten und die Penh-Werte beider Genotypen weitestgehend wieder ihr Ausgangsniveau.

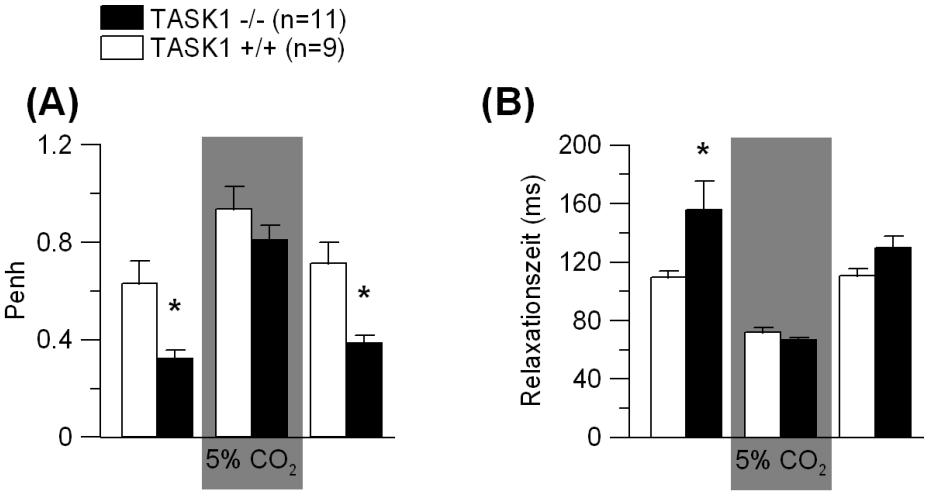

Abb. 24: Penh und Relaxationszeit bei Männchen unter Hyperkapnie: (A) Die Penh war bei den Knockouttieren in der Vor- und Nachkontrolle kleiner. (B) Die TASK1$^{-/-}$-Mäuse wiesen nur in der Vorkontrolle eine längere Relaxationszeit auf.

4.3.3 Langzeithypoxie

Mit Hilfe der 24h-Hypoxieserie sollte eruiert werden, wie die Atmungsparameter der Mäuse im Langzeitverlauf unter Hypoxie reagieren. Insbesondere sollte untersucht werden, inwieweit die Atemdepression, welche auf den initialen Anstieg unter Hypoxie folgt, im Laufe der 24h kompensiert werden kann. Physiologischerweise kommt es bei Wildtyptieren zu einem erneuten Anstieg der zentralen Atmungsparameter, welcher unter anderem auf einer verstärkten renalen Bikarbonatausscheidung basiert. Die vermehrte Bikarbonatexkretion führt zu einer Normalisierung der Hypoxie-induzierten respiratorischen Alkalose im Blut bzw. Liquorraum, welche sich hemmend auf TASK-artige Kanäle auswirken könnte (Neubauer and Sunderram, 2004). Der initiale Peak unter Hypoxie, die darauffolgende Atemdepression und der anschließende Anstieg des Minutenvolumens konnte im Rahmen dieser Messung sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Wildtyptieren beobachtet werden.

Das Experiment wurde mit einer Eingewöhnungsphase begonnen, dann wurde die Kontrollphase aufgezeichnet und über einen Zwischenschritt mit 15% O_2 wurde dann der Sauerstoffgehalt für 24h auf 10% abgesenkt. Durch die moderate Absenkung auf 15% O_2 änderten sich die zentralen Atmungsparameter im Vergleich zur Kontrollphase mit Raumluft kaum, weswegen die Zwischenphase mit einem Sauerstoffgehalt von 15% für die Auswertung nicht weiter berücksichtigt wurde.

4.3.3.1 Langzeithypoxie bei weiblichen Mäusen

Keine Veränderung des Minuten-, des Tidalvolumens und der Frequenz durch den TASK1-Knockout

Betrachtet man Abbildung 25, dann waren auch in dieser Messreihe die drei zentralen Atmungsparameter der weiblichen Mäuse identisch. Beide Genotypen wiesen ein ähnliches Tidalvolumen und eine weitgehend gleiche Atemfrequenz auf, wodurch sich auch das Minutenvolumen nicht unterschied.

Das Minutenvolumen stieg während der ersten 15min um ca. 30% an (initialer Hypoxie-induzierter Atemantrieb). Aufgrund der großen Standardabweichung wurde das Signifikanzniveau innerhalb der jeweiligen Gruppen jedoch nicht erreicht (WT n=6, p=0,07; TASK1$^{-/-}$ n=5, p=0,13). Im weiteren Verlauf gingen die Minutenvolumina wieder auf die Ausgangswerte zurück (nachfolgende Atemdepression), ehe dann nach sieben Stunden Hypoxie die jeweiligen Maximalwerte gemessen wurden. Während das Minutenvolumen bei TASK1$^{-/-}$-Tieren nur wenig absank, näherten sich die Wildtypmäuse kontinuierlich ihrem Normoxie-Wert an. Aufgrund der Streuung und der im Vergleich zu den Messserien mit männlichen Tieren geringeren Anzahl untersuchter Mäuse konnte keine eindeutige Mehratmung der TASK1$^{-/-}$-Tiere beobachtet werden.

Das Tidalvolumen der Wildtyp-Mäuse stieg in den ersten 15 Minuten um 38% (n=6, p=0,043), während dass der TASK1$^{-/-}$-Tiere um 23% anwuchs (n=5, p=0,021). In der Folge konnte für beide Gruppen keine signifikante Abweichung mehr bezüglich des Kontrollwertes detektiert werden. Genau wie das Minutenvolumen unterschied sich das Tidalvolumen der Genotypen fast das komplette Experiment hindurch nicht.

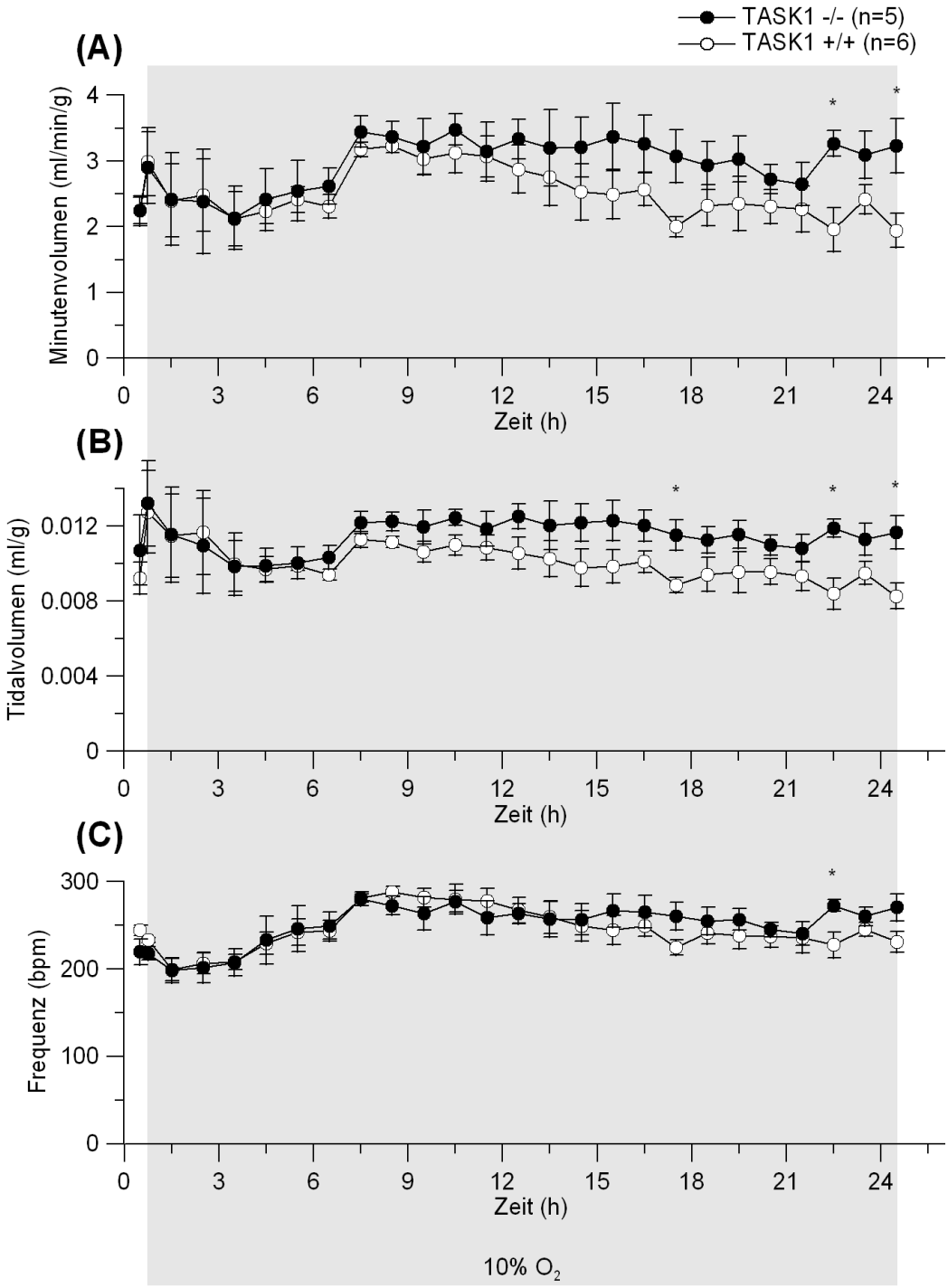

Abb. 25: Minutenvolumen, Tidalvolumen und Frequenz bei Weibchen unter Langzeithypoxie: Nach einem initalen Anstieg verursachte die Reduktion des Sauerstoffgehaltes auf 10% eine Atemdepression, bevor sich die Atmungsparameter wieder erholten. Am Experimentende lag das Knockout-Minutenvolumen (A) über dem der Wildtypen, was hauptsächlich auf einem weniger starken Abfall des Tidalvolumens (B) der TASK1$^{-/-}$-Tiere beruhte. Die Frequenz (C) war zwischen den Genotypen nicht verschieden.

Durch den TASK1-Knockout verlängerte Relaxationszeit bzw. eine verkürzte "Enhanced Pause" (Penh)

Wie man in Abbildung 26 sieht, wurde die Relaxationszeit durch den TASK1-Knockout unter Normoxie verlängert. Die Hypoxie führte innerhalb der ersten sechs Stunden zu einem ca. 40% Abfall der Relaxationszeit bei beiden Genotypen. Der reduzierte Sauerstoffgehalt führte bei allen Mäusen zu einem starken Anstieg der Penh-Werte gleich zu Beginn. Die "Enhanced Pause" (Penh) der TASK1$^{-/-}$-Mäuse stieg in der dritten Hypoxiestunde auf ihr Maximum an, bevor die Werte wieder etwas absanken. Der Verlauf bei den Wildtypmäusen war biphasisch mit einem Anstieg innerhalb der ersten Stunden, der von einem Abfall sowie einem zweiten Anstieg nach 10 Stunden gefolgt wurde.

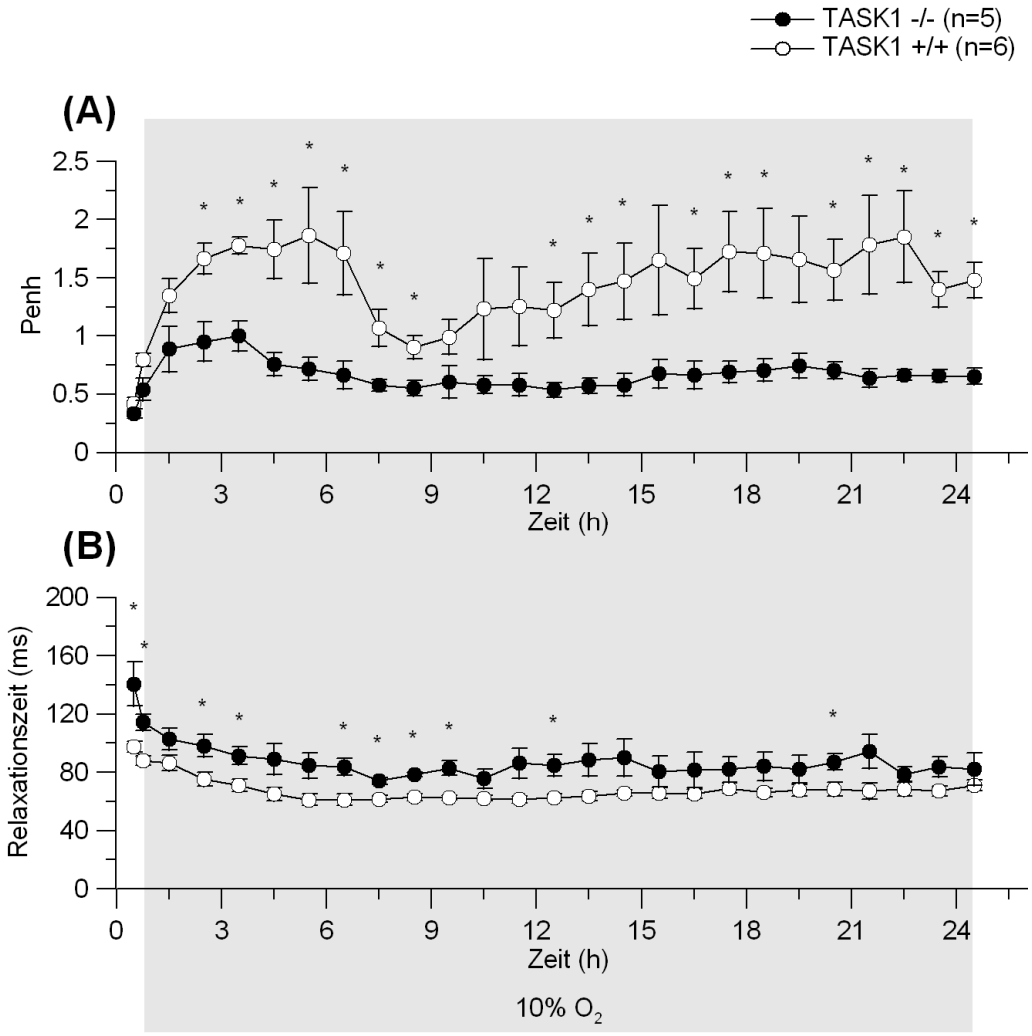

Abb. 26: Penh und Relaxationszeit bei Weibchen unter Langzeithypoxie: Die "Enhanced Pause" (Penh) (A) war bei Wildtypmäusen unter Hypoxie erhöht. Dies basierte unter anderem auf einer verlängerten Relaxationszeit bei TASK1$^{-/-}$-Mäusen (B).

4.3.3.2 Langzeithypoxie - männliche Mäuse

Männliche TASK1$^{-/-}$-Mäuse zeigten eine vertiefte Atmung unter Langzeithypoxie

Die TASK1$^{-/-}$-Mäuse wiesen unter Normoxie (siehe Abb. 27) und großteils auch unter Hypoxie ein höheres Minutenvolumen als die Wildtypgruppe auf. Das Absenken des Sauerstoffgehaltes in der zugeführten Luft auf 10% führte nach 15 min in der Wildtypgruppe zu einer deutlich stärkeren Zunahme des Minutenvolumens (initialer Hypoxie-induzierter Atemantrieb) als bei den Knockoutmäusen. In der darauffolgenden Atemdepression sank das Minutenvolumen beider Genotypen nach drei Stunden auf die tiefsten Werte. Die anschließende Erholung des Minutenvolumens erfolgte stetig und nach 13 Stunden wurden die höchsten Werte erreicht. Die Mehratmung der TASK1$^{-/-}$-Mäuse beruhte auf einem deutlich erhöhten Tidalvolumen, das heißt, die Tiere zeigten eine vertiefte Atmung.

Unter Kontrollbedingungen atmeten die TASK1$^{-/-}$-Tiere im Vergleich zu den Wildtypen schneller (siehe Abb. 27). Unter Hypoxie fehlte bei den Knockoutmäusen der initiale Frequenzanstieg, das Minutenvolumen stieg dennoch aufgrund eines starken Anstiegs des Tidalvolumens. Die Wildtypmäuse zeigten auf Hypoxie hin eine gesteigerte Atemfrequenz, bei ihnen fiel jedoch der Anstieg des Tidalvolumens geringer aus.

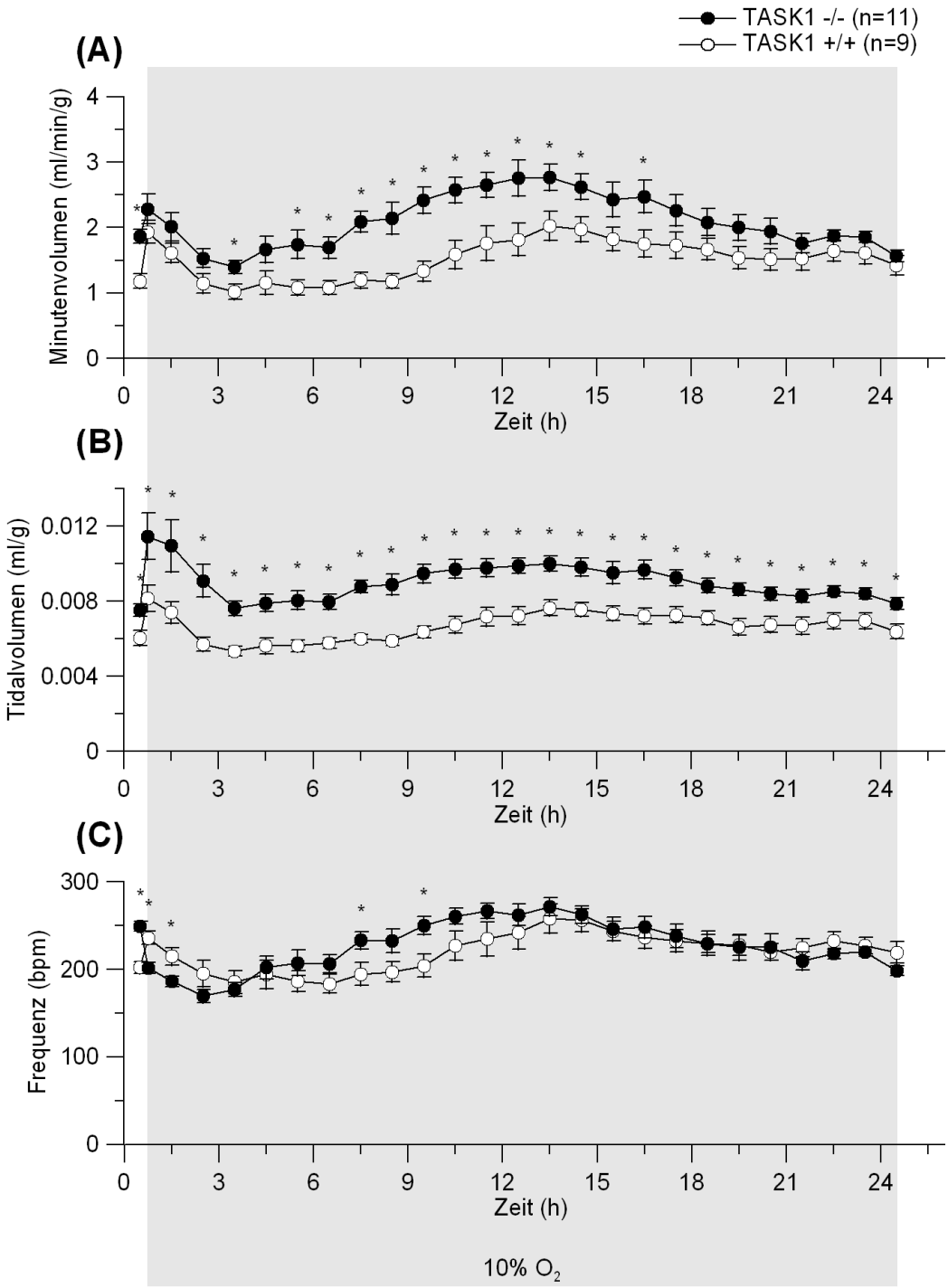

Abb. 27: Minutenvolumen, Tidalvolumen und Frequenz bei Männchen unter Langzeithypoxie: (A) Durch die Hypoxie stieg das Minutenvolumen kurz an und sank dann unter das Ausgangsniveau ab, ehe nach 6-8 h ein deutlicher Zuwachs erfolgte. (B) Wirkung der Langzeithypoxie auf die Tidalvolumina. Besonders die Knockouttiere zeigten einen starken Anstieg. (C) Die Atemfrequenz stieg bei TASK1$^{-/-}$-Mäusen im Gegensatz zu Wildtyptieren in der initialen Hypoxiephase nicht an. Im späteren Verlauf verhielten sich die Frequenzen bei beiden Genotypen ähnlich.

Abbildung 28 zeigt, dass das erhöhte TASK1$^{-/-}$-Tidalvolumen zumindest in der ersten Hälfte des Experimentes mit einem höherem Peak inspiratory flow (PIF) einher geht. Tendenziell wiesen die Wildtypmäuse darüber hinaus auch einen geringeren Peak expiratory flow (PEF) auf.

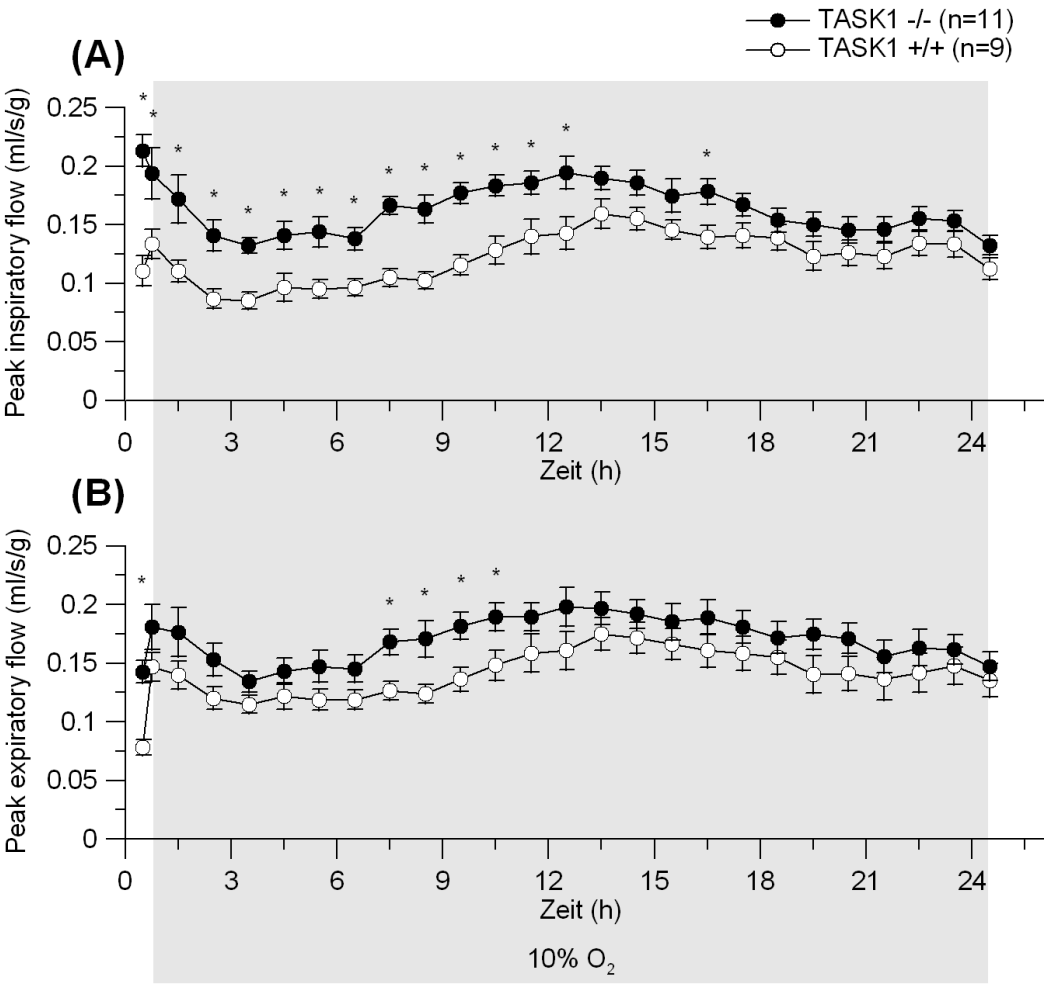

Abb. 28: PIF und PEF bei Männchen unter Langzeithypoxie: Sowohl der Peak inspirtory flow (A) als auch der Peak expiratory flow (B) waren bei TASK1$^{-/-}$-Mäusen erhöht.

<u>Hypoxie führte zu deutlichen genotypabhängigen Unterschieden der Penh und der Relaxationszeit</u>

Wie man in Abbildung 29 sieht, war die Relaxationszeit bei Raumluft in dieser Serie gleich. Die Hypoxie wirkte sich bei den Wildtyp- und den Knockouttieren unterschiedlich auf die Relaxationszeit aus: Während die Wildtyptiere mit einer schnellen Verkürzung reagierten, kam es bei den Knockouttieren zum Anstieg. Der "Enhanced Pause"-Wert (Penh) der Wildtyptiere stieg unter Hypoxie dramatisch an und hatte sich nach 240 Minuten nahezu verfünffacht. Bei den TASK1$^{-/-}$-Mäusen kam es lediglich zu einer Verdreifachung der Penh.

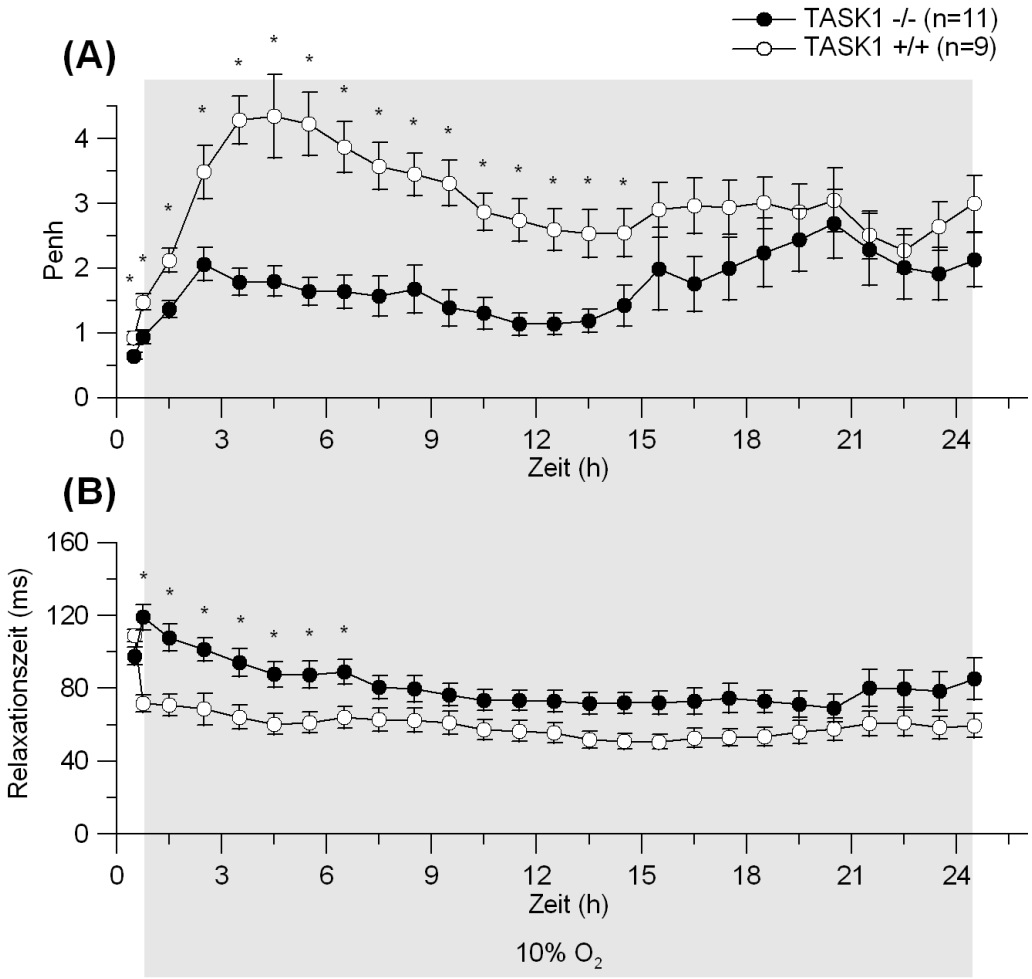

Abb. 29: Penh und Relaxationszeit bei Männchen unter Langzeithypoxie: (A) Wildtyptiere zeigten einen enormen Hypoxie-induzierten Anstieg der "Enhanced Pause" (Penh), bei Knockouttieren fällt der Antieg kleiner aus. (B) Hypoxie führt bei Wildtyptieren zur Verkürzung der Relaxationszeit, bei den Knockouttieren jedoch zu einer Zunahme.

4.3.4 Überprüfung der schnellen Hypoxieantwort

In der 24h-Hypoxieserie wurde bei den Männchen nach der Kontrollperiode eine Gewöhnungsphase mit 15% O_2 eingeschoben, bevor die Sauerstoffkonzentration weiter abgesenkt wurde. Dadurch war es nicht möglich, Rückschlüsse auf die schnelle Hypoxieantwort zu ziehen. In einer unabhängigen Serie wurde nun die schnelle Antwort auf 10% Sauerstoff in der Atemluft untersucht.

<u>TASK1-Knockouttiere antworteten auf Hypoxie hauptsächlich mit einer vertieften, nicht mit einer schnelleren Atmung</u>

Die größeren Standardabweichungen beim Minuten-, Tidalvolumen und der Frequenz deuten daraufhin, dass die TASK1$^{-/-}$-Mäuse unruhiger als die Wildtyptiere atmeten (siehe Abb. 30).

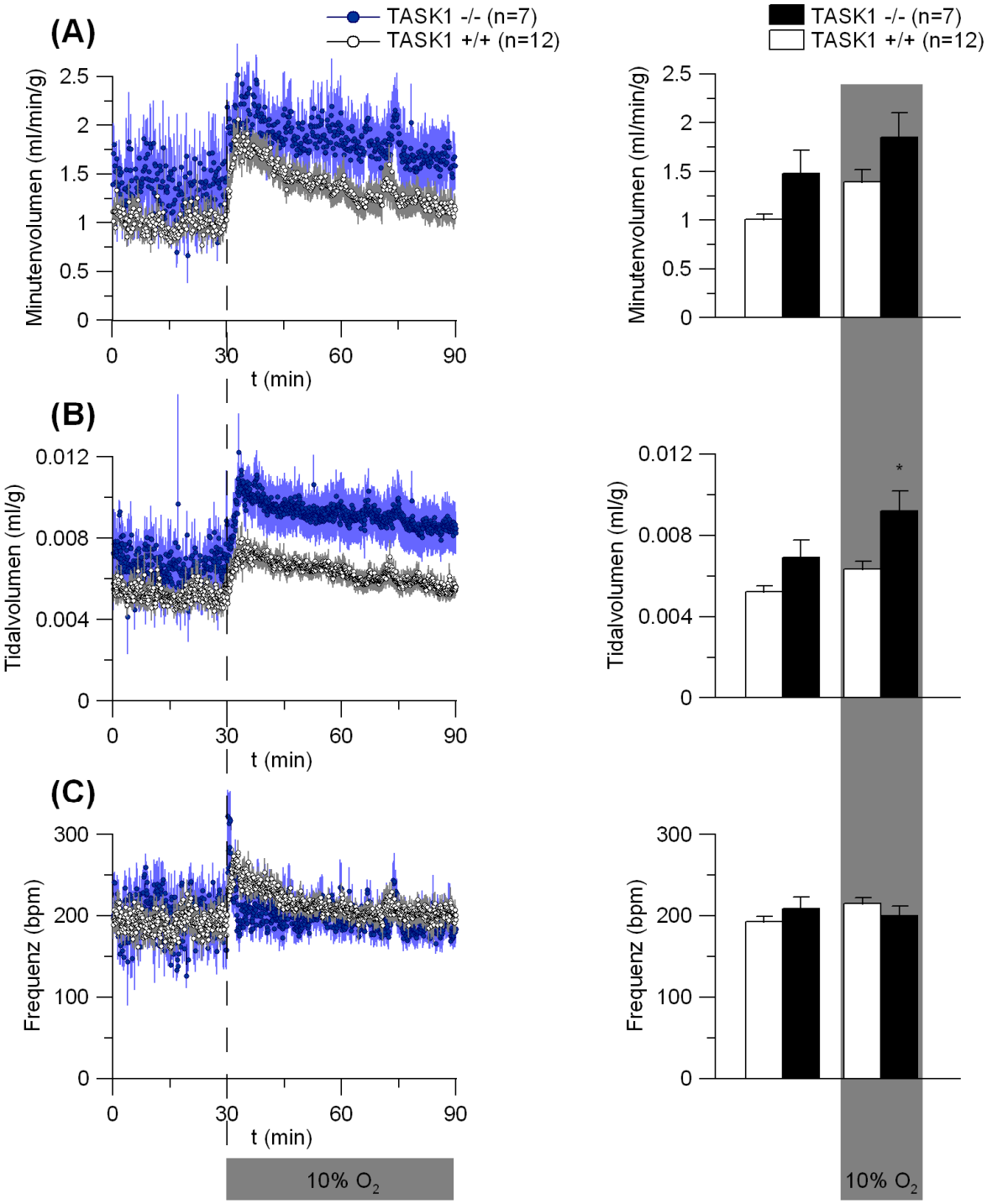

Abb. 30: Minutenvolumen, Tidalvolumen und Frequenz bei Männchen unter akuter Hypoxie: Auf der linken Seite ist der zeitliche Verlauf (Intervall 5s) dargestellt, rechts die Zusammenfassungen. Wildtyp- und TASK1-Knockouttiere antworteten mit einem Anstieg des Minutenvolumens (A) und des Tidalvolumens (B) auf die Hypoxie. Der Frequenzanstieg (C) war bei TASK1-Knockoutmäusen jedoch sehr transient und weniger ausgeprägt als bei Wildtyptieren.

Hypoxie löste bei beiden Genotypen einen Anstieg des Minutenvolumens aus, der bei den TASK1$^{-/-}$-Mäusen vor allem durch den Anstieg des Tidalvolumens getragen wurde, die Frequenz änderte sich – anders als bei den Wildtypmäusen – bei den Knockoutmäusen

nur äußerst transient (siehe Abb. 30). Das erhöhte Tidalvolumen der Knockouttiere ging einher mit einem erhöhten Peak inspiratory flow (PIF) und einem vergrößerten Peak expiratory flow (PEF), was in Abbildung 31 dargestellt ist.

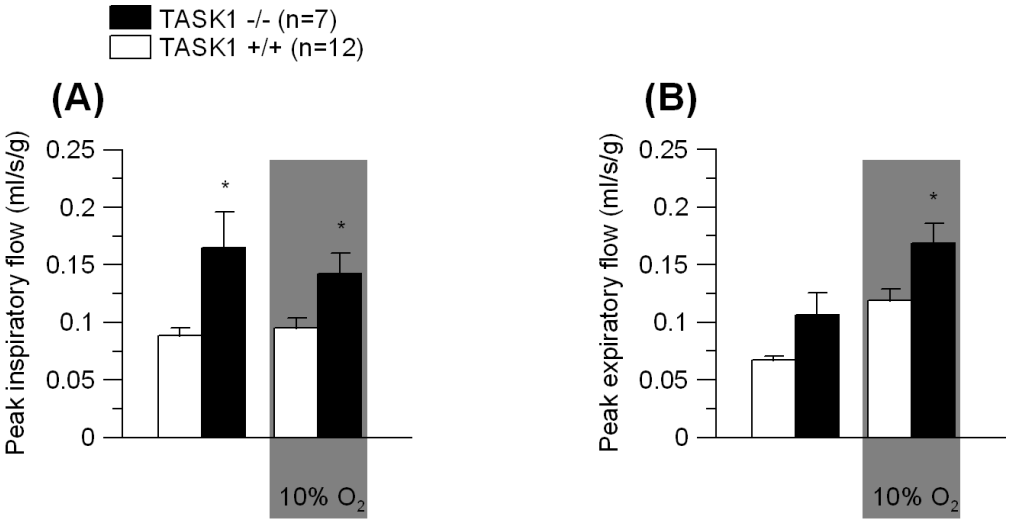

Abb. 31: PIF und PEF bei Männchen unter akuter Hypoxie: Bei TASK1$^{-/-}$-Mäusen war die maximale inspiratorische Stromstärke (PIF) in der Kontrollphase (30min) und während akuter Hypoxie (60min) erhöht (A). Hingegen war die maximale exspiratorische Stromstärke (PEF) nur unter Hypoxie vergrößert (B).

4.3.5 Isofluran

Durch Untersuchungen auf Zellebene ist bekannt, dass volatile Anästhetika zu einer starken Aktivierung von TASK1 führen (Buckler *et al.*, 2000; Washburn *et al.*, 2003), was möglicherweise die atemdepressive Wirkung von Isofluran erklärt. Durch eine stufenweise Steigerung der Isoflurankonzentration in der zugeführten Luft sollte nun untersucht werden, welchen atmungsphysiologischen Einfluss der TASK1-Knockout auf die Sensibilität gegenüber volatilen Anästhetika *in vivo* hat. Diese Messserie wurde nur mit männlichen Tieren durchgeführt.

<u>Isofluran supprimierte den Atemantrieb bei beiden Genotypen</u>

Wie man in Abbildung 32 sieht, wiesen die Wildtypmäuse in der Kontrollphase unter Normoxie und über weite Teile der Messperiode mit Isofluran ein niedrigeres Tidalvolumen auf als die TASK1$^{-/-}$-Mäuse. Bei niedrigen Isoflurankonzentrationen blieben die Tidalvolumina beider Genotypen annähernd konstant. Bei einem Isoflurangehalt von 1% wurden dann die Minimalwerte erreicht, bevor in der Nachkontrolle wieder das Ausgangsniveau erreicht wurde. Der Unterschied beim Tidalvolumen wurde durch den Befund gestützt, dass die PIF- bzw. die PEF-Werte bei Wildtyptieren geringer waren als in der Knockoutgruppe (siehe Abb. 33).

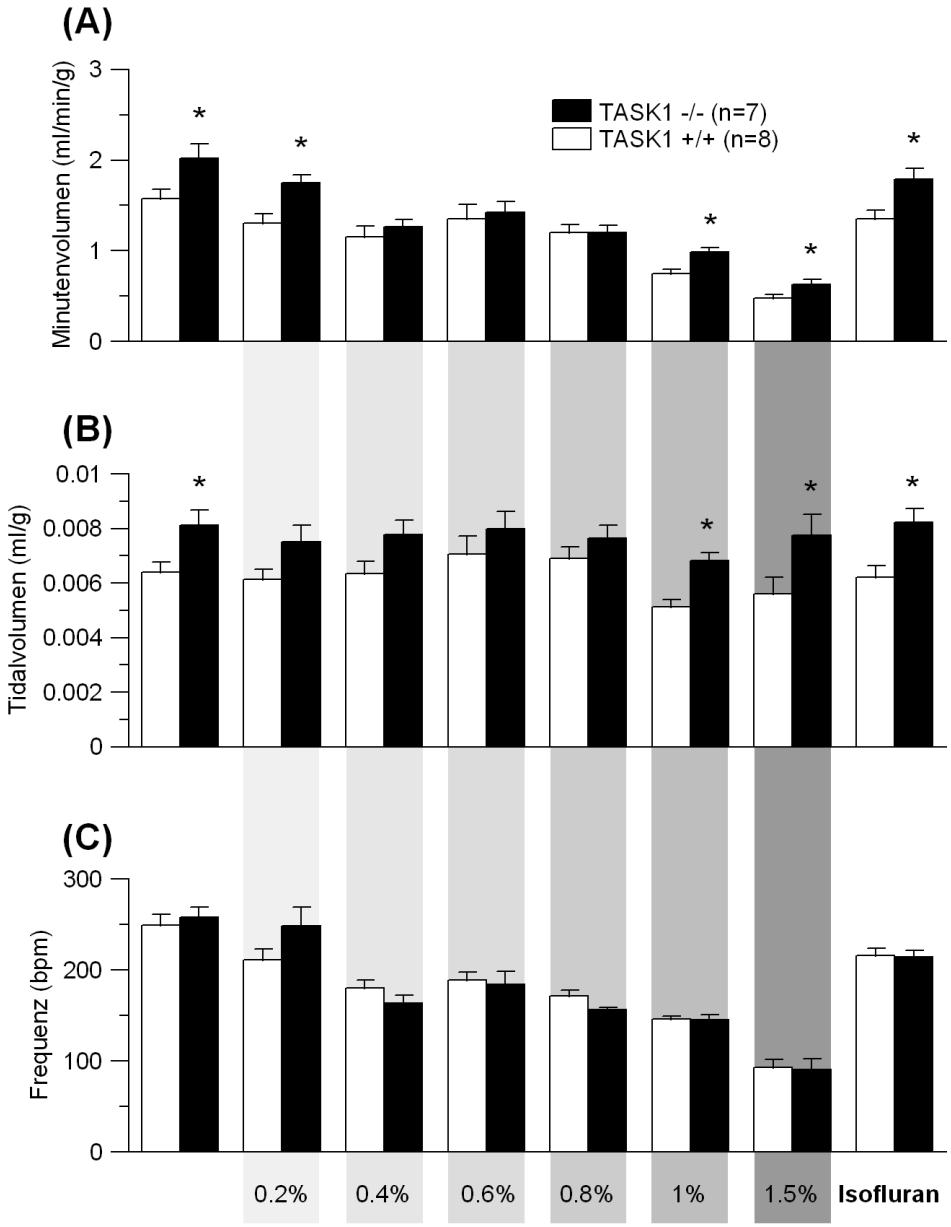

Abb. 32: Minutenvolumen, Tidalvolumen und Frequenz bei Männchen unter Isofluran: Isofluran senkte bei beiden Genotypen konzentrationsabhängig das Minutenvolumen (A) und die Atemfrequenz (C). Der Einfluss auf das Tidalvolumen (B) war bei beiden Genotypen relativ gering. Auch in dieser Serie wiesen die TASK1-Knockouttiere bereits unter Kontrollbedingungen ein größeres Tidalvolumen auf.

Die Atemfrequenz beider Genotypen dargestellt in Abbildung 32 unterschied sich während des gesamten Experimentes nicht. Ab einer Isoflurankonzentration von 0,4% sank die Frequenz bei beiden Genotypen signifikant ab und betrug am Ende nur noch ein Drittel des Anfangswertes. In den ersten 30 Minuten ohne Isofluran stieg die Frequenz aller Mäuse dann wieder bis auf ca. 80% des Kontrollwertes an.

Dadurch dass das Tidalvolumen nahezu konstant blieb, basierte die kontinuierliche Verringerung des Minutenvolumens unter Isofluran hauptsächlich auf dem deutlichen

Frequenzrückgang (siehe Abb. 32 und Abb. 34). In der letzten Messperiode (1,5% Isofluran) hatten sich die Minutenvolumina um ca. 70% reduziert. In der Nachkontrolle bewegte sich das Minutenvolumen der TASK1-Knockout- bzw. jenes der Wildtypgruppe in Richtung des Kontrollwertes. Die unter Normoxie vorherrschende Mehratmung bei Knockouttieren ließ sich über weite Strecken auch unter Isofluran nachweisen.

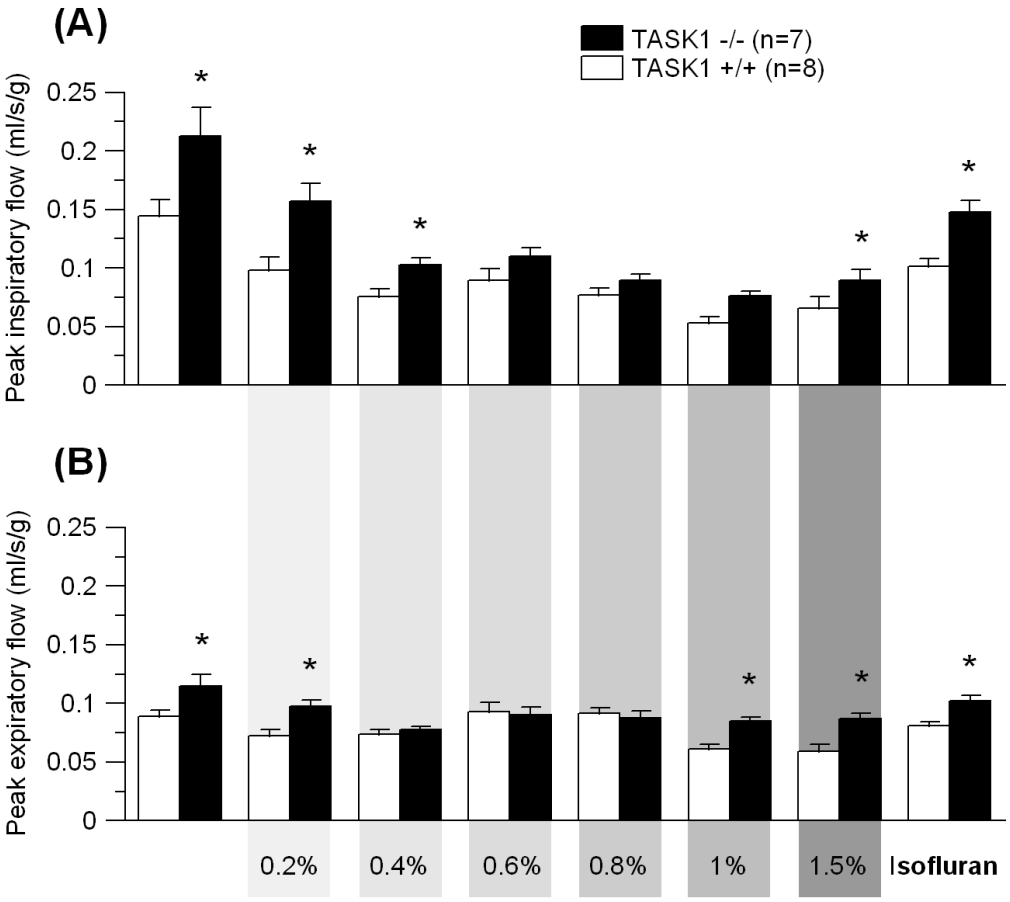

Abb. 33: PIF und PEF bei Männchen unter Isofluran: Durch Isofluran verringerte sich Peak inspiratory flow (PIF) bei beiden Genotypen deutlich (A), die Auswirkungen auf den Peak expiratory flow (PEF) waren geringer.

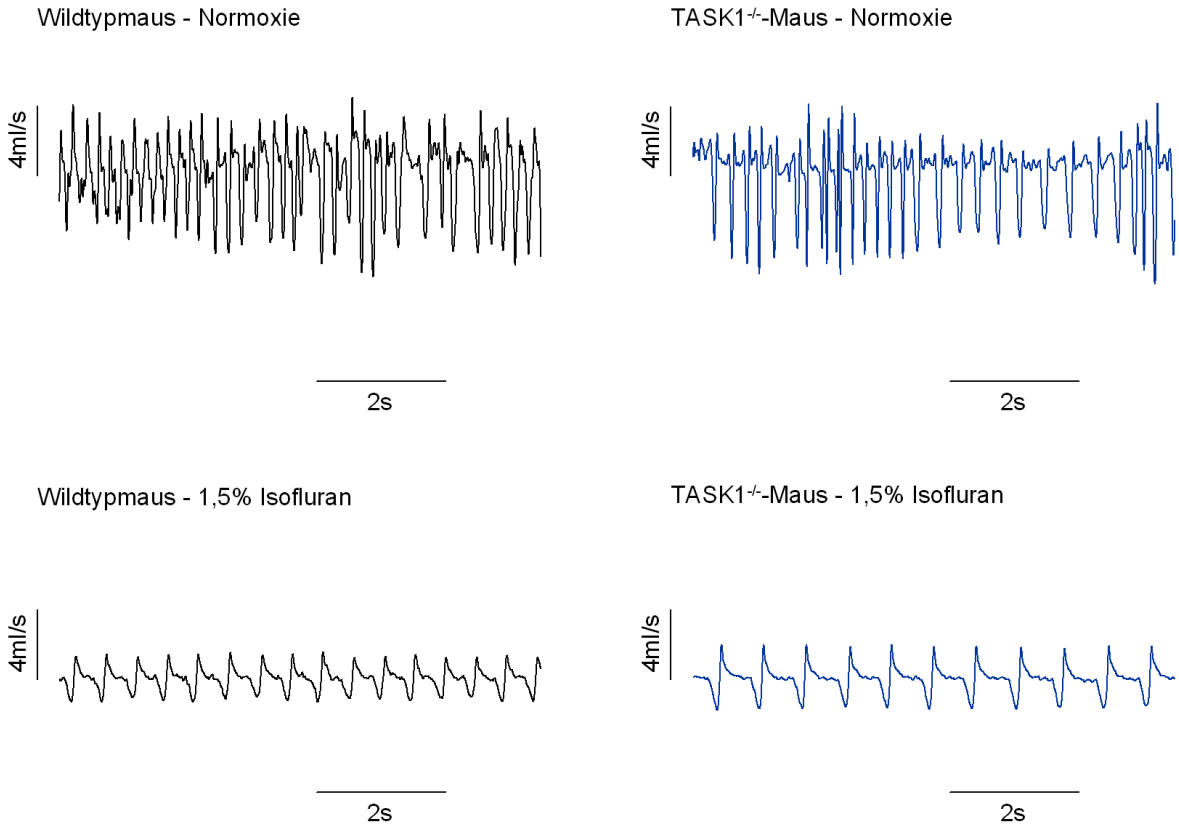

Abb. 34: Originalkurven der Atemstromstärken von zwei Männchen unter Isofluran: Bei 1,5% Isofluran verlangsamte sich die Atmung der Wildtyp- bzw. der TASK1$^{-/-}$-Mäuse und die Amplituden der Atemstromstärken, besonders die Ausschläge nach unten (entspricht inspiratorischen Flüssen) nahmen ab.

4.3.6 Hyperkapnie unter Isofluran

Volatile Anästhetika und Hypoxie verringern die Sensitivität peripherer Chemorezeptoren für Kohlendioxid (Mulkey *et al.*, 2004). Weiter oben wurde bereits beschrieben, dass die CO_2-Antwort auch bei TASK1$^{-/-}$-Tieren erhalten war. Auch die Sensibilität der Atmung gegenüber Isofluran unterschied sich nicht wesentlich zwischen den Genotypen. Es sollte nun untersucht werden, ob sich die Reaktion auf eine Hyperkapnie-Phase unter Isofluran durch den TASK1-Knockout verändert. Hierfür wurden zuerst die Atmungsparameter bei männlichen Tieren unter Hyperkapnie gemessen, bevor dann die Reaktion auf Hyperkapnie unter Isofluran untersucht wurde.

<u>Isofluran führte zur Auslöschung der CO_2-Atemantwort</u>

In dieser Serie von Experimenten (siehe Abb. 35) wurde zur besseren Vergleichbarkeit zunächst die Wirkung von 5% CO_2 in der Abwesenheit von Isofluran untersucht. Wie bereits unter Punkt 4.3.2.2 beschrieben, führte CO_2 zu einer Verdoppelung des Atemminutenvolumens, basierend auf einer Erhöhung der Atemfrequenz und des

Tidalvolumens. Die maximalen Atemwerte waren dabei bei TASK1$^{-/-}$-Mäusen tendentiell höher. Nach einer Kontrollphase wurden die Tiere dann Isofluran (1%) ausgesetzt. Wie zu erwarten war, kam es zu einer Erniedrigung des Minutenvolumen verursacht durch einen Abfall der Atemfrequenz. Das Tidalvolumen blieb wie in der vorangegangenen Isofluranserie weitgehend konstant. Nun wurde CO_2 (5%) in der Anwesenheit von Isofluran appliziert. Interessanterweise übte CO_2 unter diesen Bedingungen nur noch einen sehr geringen stimulierenden Einfluss auf das Minutenvolumen aus, welcher nur im Falle der Knockouttiere signifikant war. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Isofluran die atemstimulierende Wirkung von CO_2 unabhängig vom Genotyp weitestgehend aufhob.

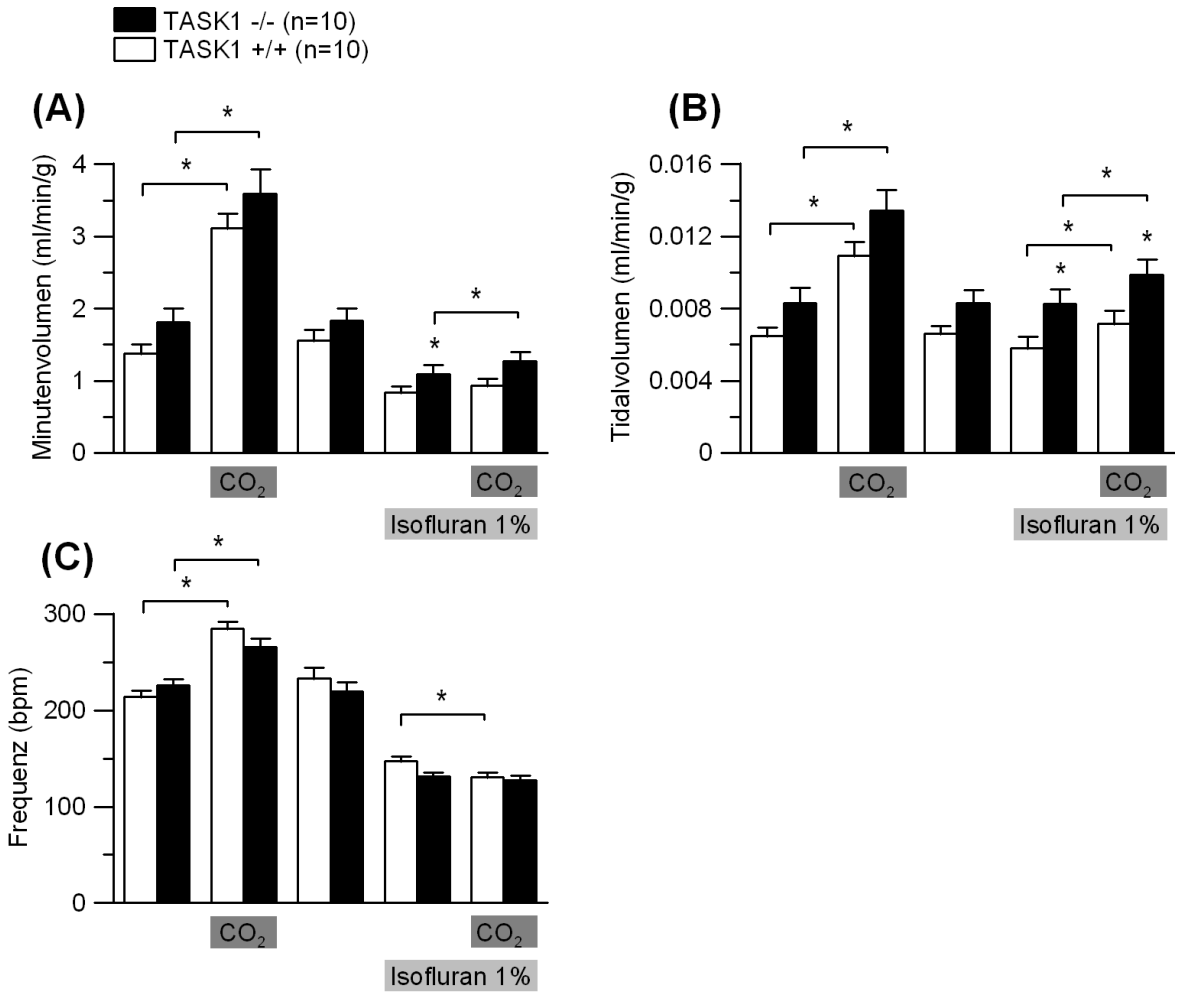

Abb. 35: Minutenvolumen, Tidalvolumen und Frequenz bei Männchen unter Hyperkapnie und Isofluran: Nach normaler CO_2-Antwort unter Kontrollbedingungen kam es durch CO_2 unter Isofluran nur zu einer geringen Zunahme des Minutenvolumens (A) und des Tidalvolumens (B); eine Erhöhung der Atemfrequenz durch CO_2 blieb unter Isofluran ganz aus (C).

5. Diskussion

Die elektrophysiologischen Eigenschaften und die hohe Expression in der Nebenniere ließen vermuten, dass TASK1 eine wichtige Rolle in der Steuerung der Nebennierenfunktion spielt (siehe Einleitung). Durch den TASK1-Knockout wurde im Mausmodell ein Hyperaldosteronismus verursacht, dessen Auswirkungen auf die Kreislaufregulation im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

TASK1-Kanäle sind zudem in zentralen und peripheren Chemorezeptoren exprimiert, welche die Atmung regulieren. Hypoxie und saure pH-Werte führen *in vitro* zu einer Hemmung des TASK1-Kaliumstroms, während das volatile Anästhetikum Isofluran aktivierend wirkt. Mit Hilfe TASK1-defizienter Mäuse konnte hier genauer eruiert werden, welchen Einfluss das Fehlen von TASK1 *in vivo* auf die Atmungsregulation hat.

5.1 TASK1-Knockout führt zu Hyperaldosteronismus und arterieller Hypertension

Aldosteron führt zu einer gesteigerten Natriumrückresorption im distalen Nephron. Die daraus entstehende Natriumretention führt zu einer Erhöhung des arteriellen Blutdrucks und zu einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Nussberger, 2003; Calhoun, 2006; Makhanova, 2008).

Unsere Arbeitsgruppe hat bei TASK1$^{-/-}$-Mäusen einen ausgeprägten Hyperaldosteronismus festgestellt, welcher auf das weibliche Geschlecht beschränkt war (Heitzmann *et al.*, 2008). Hier wurde mittels der Tail-Cuff-Blutdruckmessung der Frage nachgegangen, ob bei weiblichen TASK1$^{-/-}$-Mäusen der Hyperaldosteronismus zu Veränderungen des Blutdrucks führt. Bei der Tail-Cuff-Methode handelt es sich um eine einfache, kostengünstige und nicht invasive Möglichkeit der Blutdruckmessung. Der Vorteil der Methode liegt insbesondere darin, dass die Versuchstiere nicht operiert werden müssen und keine Narkose nötig ist. Zudem können relativ viele Tiere parallel vermessen werden. Im Vergleich zur telemetrischen Blutdruckmessung mittels implantiertem Sensor erkauft man sich diese Vorzüge mit einer geringeren Validität der Messwerte. Ein weiterer Nachteil der Tail-Cuff-Methode ist die Notwendigkeit einer Trainingsphase, um die Mäuse an die Messprozedur zu gewöhnen. Zudem ist keine kontinuierliche 24h-Messung wie bei der Telemetrie möglich.

Passend zum festgestellten Hyperaldosteronismus bei weiblichen TASK1$^{-/-}$-Mäusen konnte eine ebenfalls geschlechtsspezifische Erhöhung des Blutdruckes nachgewiesen werden. Um genauer zu klären, ob die gesteigerte Aldosteronsekretion ursächlich für den gemessenen Hypertonus ist, wurde den Versuchstieren der Aldosteronrezeptorblocker Canrenoat verabreicht. Bei einer erneuten Messung des Blutdruckes konnte im Anschluss an die Medikamentengabe bei den weiblichen TASK1$^{-/-}$-Mäusen kein arterieller

Hypertonus mehr detektiert werden. Dieser Befund spricht somit dafür, dass der Hypertonus durch den Hyperaldosteronismus verursacht wurde.

Bei männlichen TASK1$^{-/-}$-Mäusen konnte in den Vorarbeiten kein Hyperaldosteronismus gemessen werden. Die durchgeführten Blutdruckmessungen ergaben, dass die arterielle Hypertension genau wie der Hyperaldosteronismus auf das weibliche Geschlecht beschränkt war. Ohne bzw. mit Canrenoat waren die Blutdruckwerte der männlichen TASK1$^{-/-}$-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verändert.

Weiterhin war die Herzfrequenz der weiblichen TASK1$^{-/-}$-Tiere signifikant erniedrigt, womit der gesteigerte Blutdruck wahrscheinlich nicht durch einen größeren Sympathikotonus verursacht wurde. Eher scheint es so zu sein, dass durch eine verminderte Sympathikus-Aktivität den erhöhten RR-Werten entgegengewirkt werden soll. Des Weiteren spielt der Sympathikotonus einen wichtigen Part in der Modulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und könnte bei erhöhtem Aldosteron kompensatorisch erniedrigt sein (Holmer *et al.*, 1997). Gegen diesen Erklärungsansatz spricht allderings der Befund, dass die Herzfrequenz auch unter Canrenoat in der TASK1$^{-/-}$-Gruppe vermindert ist. Aufgrund der Persistenz der Bradykardie unter Canrenoat wäre ein direkter kardialer Einfluss des TASK1-Knockouts denkbar. Erste Studien weisen nach, dass TASK1 kardial exprimiert und an der kardialen Hintergrundleitfähigkeit beteiligt ist (Jones *et al.*, 2002; Putzke *et al.*, 2007; Gurney and Manoury, 2008). Somit könnte die Ursache des langsameren Pulses weiblicher TASK1$^{-/-}$-Tiere direkt am Herz liegen. Die Bradykardie zeigt genau wie der Blutdruck eine Geschlechtsabhängigkeit, da bei den männlichen Mäusen allenfalls ein tendenzieller Unterschied zwischen den Genotypen bestand.

Der durch das Fehlen von TASK1 bedingte Defekt in der Nebennierenfunktion und der Einfluss von TASK1 auf die Aktionspotentialsdauer bzw. Pulsfrequenz scheinen beim männlichen Geschlecht durch androgenabhängige Mechanismen ausgeglichen zu werden. Eine entscheidende Rolle könnte hierbei TASK3 spielen, von dem bekannt ist, dass er mit TASK1 Dimere bildet und bei männlichen Tieren vermehrt exprimiert wird (Czirjak *et al.*, 2002; Heitzmann *et al.*, 2008). So könnte der TASK1-Knockout bei Männchen durch eine Hochregulierung von TASK3 zumindest zum Teil kompensiert werden. Weiterhin haben wir Hinweise, dass das Fehlen von TASK1 auch durch andere Kaliumkanäle ausgeglichen wird.

TASK1 ist in der Gefäßmuskulatur exprimiert und trägt generell zum Ruhemembranpotential bei (Kiyoshi *et al.*, 2006). Somit war es denkbar, dass ein Fehlen zur Depolarisation führt, die eine vermehrte Vasokonstriktion verursacht. Im Rahmen der thermographischen Untersuchung des Blutflusses am Mäuseschwanz erhärtete sich jedoch dieser Verdacht auf einen gesteigerten Gefäßtonus durch den TASK1-Knockout nicht.

Die von uns verwendete Messmethode basierte darauf, eine Korrelation zwischen der Schwanzdurchblutung und der thermographisch detektierbaren Wärme herzustellen. Konkret bedeutet dies, dass sich beispielsweise eine vermehrte Durchblutung in einer stärkeren Wärmeabstrahlung widerspiegelt. Eine geringere Wärmeabstrahlung weist somit letztlich auf eine verstärkte Vasokonstriktion hin. Insgesamt ermöglicht die gewählte Messmethode nur eine orientierende, grobe Einschätzung des Gefäßtonus. Um letztlich eine sichere Aussage über den Gefäßtonus mit bzw. ohne TASK1-Knockout treffen zu können, muss man in zukünftigen Projekten die Anwendung feinerer Messmethoden erwägen. Denkbar wäre z.B. die direkte Messung des Gefäßwiderstandes an Gefäßpräparaten.

5.2 Respiration

Die Rolle von TASK1 für die Atmungsregulation wurde mittels Plethysmographie untersucht. Aufgrund der Empfindlichkeit von TASK1 gegenüber Hypoxie, Hyperkapnie und Isofluran *in vitro* wurden die plethysmographischen Experimente mit eben jenen Stimuli durchgeführt.

In allen Experimenten hingen die Auswirkungen des TASK1-Knockouts ebenfalls vom Geschlecht der Versuchstiere ab. Bei weiblichen Tieren zeigten sich keine genotypabhängigen Unterschiede: Die zentralen Atmungsparameter wie Minutenvolumen, Tidalvolumen und die Atemfrequenz der weiblichen Wildtyp- und TASK1$^{-/-}$-Mäuse waren unter Kontrollbedingungen, unter Hypoxie und unter Hyperkapnie identisch.

Im Gegensatz dazu wiesen die TASK1$^{-/-}$-Männchen im Vergleich zu den Wildtyptieren eine generell vertiefte Atmung auf. Die Mehratmung basierte nicht auf einer gesteigerten Atemfrequenz, sondern auf einem erhöhten Tidalvolumen.

Die Mehratmung männlicher TASK1$^{-/-}$-Mäuse spricht dafür, dass androgenabhängig der TASK1-Knockout bei Männchen einen größeren Effekt auf die Atmung hat. Der zugrundeliegende Mechanismus ist allerdings noch nicht erforscht.

Ergänzend muss gesagt werden, dass das Geschlecht bei Wildtyptieren einen Einfluss auf die Atmungsparameter zu haben scheint: In unserer Studie atmeten weibliche Wildtyptiere auf das Gewicht bezogen tendenziell mehr als die männlichen Wildtypmäuse. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass in Untersuchungen am Menschen vor allem Progesteron (allein und kombiniert mit Östrogen) die Atmung stimulierte (Tatsumi, 1999; Behan *et al.*, 2003). Denkbar wäre somit, dass der TASK1-Knockout bei weiblichen Mäusen hormonabhängig besser kompensiert wird als bei männlichen Tieren.

Nach diesen grundsätzlichen Bemerkungen wird nachfolgend anhand der einzelnen Experimente unter Hypoxie, Hyperkapnie und Isofluran auf die Bedeutung von TASK1 für die Atmungsregulation eingegangen.

5.2.1 Kein Einfluss des TASK1-Knockout auf die Sauerstoffantwortkurve

Durch die stufenweise Reduktion des Sauerstoffgehaltes in der Inspiratonsluft von 21% O_2 auf 7% O_2 ergab sich bei den weiblichen Mäusen hinsichtlich der wichtigsten Atmungsparameter kein Unterschied zwischen den Genotypen. Das Tidalvolumen, das Minutenvolumen und die Atemfrequenz der TASK1$^{-/-}$-Tiere war identisch mit dem der Kontrolltiere.

Auch TASK1$^{-/-}$-Männchen zeigten eine normale Sauerstoffantwortkurve. Allerdings wiesen sie unter Normoxie und Hypoxie im Vergleich zu Wildtypmännchen ein permanent erhöhtes Tidalvolumen auf. Der Unterschied beim Tidalvolumen fußte im Wesentlichen auf einem größeren Peak inspiratory flow (PIF). Die Frequenz hingegen veränderte sich durch den TASK1-Knockout ähnlich wie beim weiblichen Geschlecht kaum. Aufgrund der Differenz beim Tidalvolumen wurde auch ein signifikant vermehrtes TASK1$^{-/-}$-Minutenvolumen detektiert. Die genaue Ursache dieser vertieften Atmung konnte im Rahmen unserer Untersuchungen bisher nicht eruiert werden. Durch Blutgasanalysen konnte eine metabolische Azidose als Grund ausgeschlossen werden (unveröffentlichte Daten Dr. Barhanin). Der TASK1-Knockout scheint daher auf anderem Wege die vertiefte Atmung zu bewirken. Denkbare Angriffspunkte wären die Carotid Bodies, atmungsregulatorische Hirnstammregionen oder ein verminderter Hering-Breuer-Reflex. Letzterer besagt, dass durch die Dehnung der Lunge bei Inspiration die inspiratorischen Neurone des Atemzentrums inhibiert werden. Grundlegend für eine vertiefte Atmung wäre somit ein reduzierter Hering-Breuer-Reflex. Der molekulare Mechanismus hierfür könnte durch den TASK1-Knockout beeinflusst sein. Der Befund der Mehratmung durch den TASK1-Knockout ist insofern interessant, da 2P-Domänen-Kaliumkanäle grundsätzlich hyperpolarisierend wirken. Durch das Fehlen von TASK1 müsste es somit zu einer Depolarisation kommen. Bedenkt man nun, dass TASK1 stark in den atmungssteuernden Zentren der Medulla oblongata vertreten ist, könnte sich hiermit die generelle Hochregulation des Minutenvolumens erklären lassen (Washburn *et al.*, 2003). Die vertiefte Atmung könnte zudem auf einer durch den TASK1-Knockout veränderten peripheren Chemorezeption beruhen, da sich in den Glomera carotica eine Kalium-Hintergrundleitfähigkeit findet, die mit den Eigenheiten von TASK1 übereinstimmt (O'Kelly *et al.*, 1999; Buckler *et al.*, 2000; Hartness *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009).

5.2.2 Verkleinerung der Penh durch den TASK1-Knockout

Klassischerweise wird die Penh („Enhanced Pause“) im Rahmen plethysmographischer Experimente als Maß für den Atemwegswiderstand herangezogen (Zeldin *et al.*, 2001; Goldsmith *et al.*, 2002). Aufgrund der zahlreichen Parameter (Relaxationszeit, Peak

expiratory flow, Peak inspiratory flow und Expirationszeit), die für die Berechnung der Penh benötigt werden, ist die Beurteilung diffizil und umstritten. So konnte beispielsweise nicht immer eine Korrelation zwischen der Penh und dem Atemwegswiderstand hergestellt werden (Petak *et al.*, 2001). Die Zweifel beruhen insbesondere darauf, dass die Penh kein direktes und zuverlässiges Maß für die Lungenmechanik (Compliance bzw. Atemwegswiderstand) ist (Bates *et al.*, 2004). Bekräftigt wird dies durch Erkenntnisse, dass die "Enhanced Pause" (Penh) zusätzlich durch zahlreiche andere Phänomene wie z.B. eine veränderte neuronale Steuerung, Schmerz oder Unwohlsein beeinflusst werden kann (Adler *et al.*, 2004; Pauluhn, 2004).

Bei den Weibchen beruhte die verkürzte Penh hauptsächlich auf einer durch den TASK1-Knockout verlängerten Relaxationszeit (die Relaxationszeit umschreibt die Phase der Exspiration, die benötigt wird bis 64% des Tidalvolumens ausgeatmet sind). Ein ähnlicher Befund zeigte sich bei den Männchen. Neben der Differenz bei der Relaxationszeit basierte der Penh-Unterschied bei diesen auf einem im Vergleich zur Kontrollgruppe vergrößerten Peak expiratory flow bzw. Peak inspiratory flow der TASK1$^{-/-}$-Tiere.

Durch die zahlreichen Faktoren, welche die Penh beeinflussen, ist eine genaue Interpretation schwierig. Inwiefern TASK1 in der Bronchialmuskulatur exprimiert ist und somit dort Einfluss auf die elektrochemische Regulation hat, ist leider noch unklar. Durch die TASK1-Expression im Hirnstamm könnte die Penh aber auch über eine zentrale Änderung des Atemmusters beeinflusst werden. Ein denkbarer Schritt zur genaueren Analyse der Veränderungen hinsichtlich Penh und Relaxationszeit wäre zunächst eine direkte Bestimmung des Atemwegswiderstands. Bisher konnte dies in unserer Arbeitsgruppe nicht verwirklicht werden.

5.2.3 Schnelle Hypoxieantwort: Attenuierter Frequenzanstieg durch den TASK1-Knockout

Im Rahmen dieses Experimentes wurden die Versuchstiere ohne Zwischenschritte einem starken hypoxischen Stimulus (10% O_2) ausgesetzt. Für die Adaptation auf eine plötzliche Reduktion der O_2-Konzentration sind verschiedene Zellen wichtig wie die Glomus Typ1-Zellen, Pulmonalarterienmyozyten oder neuroepitheliale Zellen in der Lunge (Patel *et al.*, 2001). Entscheidend für die periphere Chemorezeption sind aber die Typ1-Zellen der Glomera carotica. In verschiedenen Studien wurde dort eine Kalium-Hintergrundleitfähigkeit detektiert, die sich mit den Eigenschaften von TASK1 deckt (O'Kelly *et al.*, 1999; Buckler *et al.*, 2000; Hartness *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009). All dies deutet auf eine potentielle Beteiligung von TASK1 an der Steuerung der schnellen Hypoxieantwort hin.

In unseren plethysmographischen Experimenten stieg unter Hypoxie das Minutenvolumen beider Genotypen deutlich an. Interessant hierbei ist, dass die Mehratmung in der TASK1$^{-/-}$-Gruppe vor allem auf einer Zunahme des Tidalvolumens basierte. Die TASK1$^{-/-}$-Mäuse reagierten nämlich mit der Atemfrequenz auf die Hypoxie nur minimal. Im Gegensatz dazu führte die O_2-Reduktion in der Kontrollgruppe zu einem deutlichen initialen Frequenzanstieg.

Insgesamt scheint sich der TASK1-Knockout nur unmittelbar zu Beginn der Hypoxie durch einen fehlenden bzw. attenuierten Frequenzanstieg bemerkbar zu machen. Da die peripheren Chemorezeptoren vor allem für die initiale Atemantwort entscheidend sind, könnten die beobachteten Veränderungen durch eine spezifische Beeinträchtigung der peripheren Rezeptoren erklärt werden. Dieser Befund wird durch eine Studie von Trapp et al gestützt. Hierbei war die Entladungsrate an Karotissinusnerv-Präparationen durch den TASK1-Knockout bei hypoxischer Stimulation erniedrigt (Trapp *et al.*, 2008).

5.2.4 Langzeithypoxie

Bei den Weibchen verliefen die zentralen Atmungsparameter der zwei Genotypen - wie das Minuten-, das Tidalvolumen und die Atemfrequenz - in der Langzeithypoxie-Serie mit 10% O_2 fast durchgehend parallel. Bei den TASK1$^{-/-}$-Männchen wurde wieder eine Mehratmung basierend auf einem vergrößerten Tidalvolumen detektiert. Interessanterweise war diese Mehratmung auf die ersten Stunden der Messung beschränkt. Nach längerer Zeit, in unserem Experiment nach 16h, veringerte sich die Vertiefung der Atmung bei den TASK1$^{-/-}$–Männchen. Die Ursache der initial vertieften Atmung sind uns nicht bekannt. Möglicherweise spielen eine veränderte Stressreaktion und/oder Ermüdungserscheinungen hierfür eine Rolle.

5.2.5 Hyperkapnie: CO_2 unabhängig vom Genotyp als starker Atemstimulus

Aufgrund seiner Lokalisation und seiner pH-Sensibilität *in vitro* soll TASK1 an der zentralen Chemorezeption beteiligt sein. Dort wird über die Atmung der pH bzw. pCO_2 im zentralen Nervensystem kontrolliert (Bayliss *et al.*, 2001; Lesage, 2003; Mulkey *et al.*, 2004). Ein denkbarer molekularer Mechanismus wäre, dass TASK1 durch den stärksten physiologischen Atemstimulus CO_2 bzw. durch einen sinkenden pH gehemmt wird.

Für das weibliche Geschlecht konnte unter Hyperkapnie kein Unterschied hinsichtlich der zentralen Atmungsparameter, wie Minuten-, Tidalvolumen und Atemfrequenz, detektiert werden. Das Minutenvolumen wuchs zu Beginn der Hyperkapnie rapide an. Die männlichen TASK1$^{-/-}$-Mäuse zeigten sogar eine tendenziell verstärkte respiratorische Antwort auf die Hyperkapnie. Anders als bei akuter Hypoxie (siehe oben) stieg nämlich

die Atemfrequenz ähnlich wie in der Kontrollgruppe an. Zusammen mit einem stärkeren Zuwachs beim Tidalvolumen der TASK1$^{-/-}$-Gruppe ergab sich so im Vergleich eine etwas größere Zunahme des TASK1$^{-/-}$-Minutenvolumens. Dies deutet daraufhin, dass der TASK1-Knockout wohl keinen Defekt in der zentralen Chemorezeption bewirkte. Die bei den männlichen TASK1$^{-/-}$-Mäusen beobachtete vertiefte Atmung in der Hypoxieserie konnte in dieser Experimentserie zumindest teilweise beobachtet werden.

Der Befund einer intakten CO_2-Chemorezeption wird durch eine aktuelle Arbeit von Mulkey et al. gestützt, in der die pH-sensitiven Chemorezeptoren im Retrotrapezoid Nucleus ihre Funktion durch die TASK1- bzw. TASK3-Defizienz nicht verlieren, wenngleich diese Arbeitsgruppe überhaupt keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Mausgenotypen findet (Mulkey *et al.*, 2007). Die verlorene Funktion könnte durch eines der zahlreichen anderen CO_2-sensing Moleküle ersetzt werden. So gibt es die Familie der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle (Kir), die ebenso pH-sensibel sind wie die Gap junction-Kanäle und zahlreiche andere Ionenkanäle oder diverse Neurotransmittersysteme (Jiang *et al.*, 2005).

Interessanterweise war bei 5% CO_2 geschlechtsunabhängig - anders als unter Normoxie bzw. Hypoxie - keine Differenz hinsichtlich der Penh zwischen den Genotypen detektierbar. Inwieweit dieser Befund durch den TASK1-Knockout erklärt werden kann ist unklar. Denkbar wäre, dass bei den Wildtypmäusen TASK1 durch CO_2 vermehrt gehemmt wird, womit beide Genotypen keinen funktionierenden TASK1-Strom aufweisen.

5.2.6 Isofluran: Suppression des Atemantriebs bei beiden Genotypen

Durch *in vitro* Versuche konnte eine Aktivierung von TASK1 durch volatile Anästhetika wie z.B. Isofluran nachgewiesen werden (Patel *et al.*, 1999), weswegen TASK1 möglicherweise wichtig für das Verständnis der Wirkmechanismen jener Anästhetikagruppe ist (Sirois *et al.*, 2000). Aufgrund der TASK1-Expression in atmungsregulatorischen Zentren sollte mittels plethysmographischer Messungen eruiert werden, inwiefern der TASK1-Knockout die Sensibilität gegenüber volatilen Anästhetika *in vivo* beeinflusst (Medhurst *et al.*, 2001; Talley *et al.*, 2001; Washburn *et al.*, 2003).

Mit zunehmender Isoflurankonzentration verringerte sich das Minutenvolumen basierend auf einem deutlichen Frequenzrückgang in der TASK1-Knockout- und in der Kontrollgruppe kontinuierlich. Während das Tidalvolumen und die Peak expiratory flow- bzw. Peak inspiratory flow-Werte beider Genotypen in geringerem Ausmaß abnahmen. Unsere Befunde zeigen, dass TASK1 trotz seiner *in vitro* nachgewiesenen Aktivierbarkeit durch Isofluran nicht der entscheidende Angriffspunkt für die atemdepressive Wirkung des Isofluran ist. Aufgrund der großen Unklarheit über die Angriffspunkte volatiler Anästhetika lässt sich aber auch hier ein Zusammenspiel diverser Faktoren vermuten, weswegen der

TASK1-Knockout vermutlich nicht ins Gewicht fällt. Denkbar wäre beispielsweise eine Beteiligung anderer K^+-Kanäle wie TREK, TASK2 oder TASK3 oder ein K^+-Kanal unabhängiger Mechanismus. Interessant diesbezüglich ist aber, dass TASK1 die Wirkung volatiler Anästhetika andernorts zu beeinflussen scheint. Hinsichtlich der Schmerzreduktion konnte von Linden et al. festgestellt werden, dass bei TASK1$^{-/-}$-Tieren höhere Halothan- bzw. Isofluran-Konzentrationenen für den selben Effekt hinsichtlich der Schmerzreduktion benötigt werden (Linden *et al.*, 2006).

Hyperkapnie unter Isofluran

Die Sensitivität peripherer Chemorezeptoren für Hyperkapnie wird durch volatile Anästhetika und Hypoxie reduziert (Mulkey *et al.*, 2004). Unsere Experimente zeigen, dass durch den TASK1-Knockout weder die stimulierende Wirkung der Hyperkapnie noch der atemdepressive Effekt des Isofluran beeinflusst werden.

Unter Isofluran war der chemische Atemantrieb unabhängig vom Genotyp attenuiert. Bei genauerer Analyse fiel auf, dass das Tidalvolumen in beiden Genotypen anstieg, wenn die Hyperkapnie unter Isofluran durchgeführt wurde. Im Vergleich zu reiner Hyperkapnie war der stimulierende Effekt des CO_2 unter Isofluran aber deutlich geringer. Hinsichtlich der Frequenz war die atemdepressive Wirkung des Isofluran noch stärker, der Frequenzanstieg blieb nahezu aus. Dieser Befund spricht für eine zumindest partiell intakte Sensorfunktion, aber das respiratorische Netzwerk ist unter Isofluran generell gedämpft. Gestützt werden diese Erkenntnisse durch die Daten aus der oben bereits erwähnten Studie. Dort wird nachgewiesen, dass die CO_2-Sensitivität peripherer Chemorezeptoren durch volatile Anästhetika verringert wird (Mulkey *et al.*, 2004).

5.3 Physiologische Bedeutung des TASK1-Knockouts

Durch das vorhandene Knockout-Mausmodell konnten erste Erkenntnisse hinsichtlich der Bedeutung von TASK1 für die Blutdruck- bzw. die Atmungsregulation *in vivo* gewonnen werden. Diesbezüglich soll abschließend die physiologische und klinische Bedeutung des TASK1-Knockouts kurz diskutiert werden.

TASK1-Knockout führt zu Hyperaldosteronismus und arterieller Hypertension

Der TASK1-Knockout bewirkt bei weiblichen Mäusen einen Hyperaldosteronismus und einen arteriellen Hypertonus. Durch die Gabe des Aldosteronrezeptorblockers Canrenoat wird die Aldosteronabhängigkeit der Hypertonie bewiesen.

Aktuelle Daten beim Menschen zeigen eine Korrelation zwischen der Aldosteronkonzentration und den Blutdruckwerten unabhängig von der Plasma-Renin-Aktivität. Zudem verdichten sich die Hinweise, dass Hyperaldosteronismus ein

wesentlicher Faktor für die Schwere der hypertensiven Krankheit und die Therapieresistenz ist (Calhoun, 2006).

Durch den TASK1-Knockout an der Maus kommt es aber nicht zur Ausbildung eines Adenoms als Ursache für den Hyperaldosteronismus - wie es klassischerweise beim Conn-Syndrom beschrieben ist (Davies *et al.*, 2008). Am Menschen sind verschiedene seltene Formen eines Glukokortikoid supprimierbaren Hyperaldosteronismus beschrieben (Lifton *et al.*, 1992; Pascoe *et al.*, 1995). Eine davon basiert auf einer Gen-Crossover-Rekombination zwischen dem ACTH-abhängig exprimierten Gen der 11β-Hydroxylase und dem Gen der Aldosteronsynthase. Bei anderen ist der Mechanismus noch unklar (Gordon *et al.*, 1995; Mulatero *et al.*, 1998; Fardella *et al.*, 2001). Da der durch den TASK1-Knockout verursachte Hyperaldosteronismus ebenfalls Glukokortikoid-supprimierbar ist (Heitzmann *et al.*, 2008), könnte die Ursache in einer veränderten Expression von TASK1 liegen. TASK1 ist nämlich nicht nur in der Nebenniere der Maus, sondern auch in der Nebenniere des Menschen stark exprimiert (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.645288). Genaue genetische Analysen könnten hier zusätzliche Erkenntnisse erbringen.

Atmung

Insgesamt verändert der TASK1-Knockout die Chemorezeption nicht wesentlich. Nur der Anstieg der Atemfrequenz unter Hypoxie war in der TASK1$^{-/-}$-Gruppe attenuiert. Die CO_2-Antwort war bei männlichen TASK1$^{-/-}$-Mäusen sogar stärker. TASK1 ist also ohne eine für das Überleben essentielle Funktion, denn die Sensitivität gegenüber O_2 und CO_2 blieb erhalten.

Zudem wiesen die männlichen TASK1$^{-/-}$-Mäuse eine vertiefte Atmung auf, die auf einem erhöhten Tidalvolumen basierte. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch der Befund, dass die TASK1-Expression bei männlichen Ratten mit der Neigung zu Schlafapnoe korrelieren soll (Wang *et al.*, 2008). Vorsichtig interpretiert bedeutet dies zusammen mit unserem Befund der vertieften TASK1$^{-/-}$-Atmung, dass TASK1 wohl zentral einen hemmenden Effekt auf die Atmungsregulation hat.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Genknockouts des 2P-Domänen Kaliumkanals TASK1 auf den arteriellen Blutdruck und die Atmungsregulation erforscht. Hierfür wurden am TASK1-Knockoutmausmodell Blutdruckmessungen durchgeführt, und die Atmung wurde mit Hilfe eines Ganzkörperplethysmographen untersucht.

TASK1-Knockout führt zu Hyperaldosteronismus und arterieller Hypertension

TASK1 weist in der Nebenniere die höchste Expressionsrate auf, und sein Fehlen verursacht bei weiblichen Mäusen einen ausgeprägten Hyperaldosteronismus. In Blutdruckmessungen zeigten die weiblichen TASK1$^{-/-}$-Mäuse eine deutliche arterielle Hypertension. Da gleichzeitig die Herzfrequenz der TASK1$^{-/-}$-Mäuse niedriger war als die der Wildtypgruppe, ist vermutlich der Sympathikotonus der TASK1$^{-/-}$-Tiere nicht erhöht. Damit erscheint eine Sympathikus-bedingte Erhöhung des Gefäßwiderstandes als Ursache für den Hypertonus als unwahrscheinlich. Zudem hob die pharmakologische Blockade des Aldosteronrezeptors den Hypertonus auf, was dafür spricht, dass der Hyperaldosteronismus für den beobachteten Hypertonus verantwortlich ist.

Chemorezeption bleibt durch den TASK1-Knockout weitgehend unbeeinflusst

TASK1 ist zudem in an der Atmungsregulation beteiligten Hirnstammregionen und in den Glomera carotica exprimiert. Basierend auf der *in vitro* beschriebenen Hemmbarkeit durch Hypoxie bzw. saure pH-Werte und der Aktivierbarkeit durch Isofluran wurden plethysmographische Experimente mit TASK1$^{-/-}$- und Wildtypmäusen durchgeführt.

Die Chemosensitivität für O_2 blieb durch den TASK1-Knockout im Wesentlichen unbeeinflusst. Lediglich bei akuter Hypoxie wurde in der TASK1-Knockoutgruppe ein attenuierter Frequenzanstieg festgestellt. Durch CO_2 wurde die Atmung beider Genotypen in weitestgehend identischem Ausmaß stimuliert. Es konnte ein starker Zuwachs beim Tidalvolumen und der Atemfrequenz detektiert werden, der zu einer deutlichen Steigerung des Minutenvolumens führte. Somit blieb die Chemorezeption trotz des TASK1-Knockout insgesamt erhalten.

Zudem beeinflusste der TASK1-Knockout die atemdepressive Wirkung volatiler Anästhetika nicht. Weiterhin hob Isofluran die atemstimulierende Wirkung von CO_2 unabhängig vom Genotyp weitestgehend auf.

Die plethysmographischen Messungen zeigten darüberhinaus geschlechtsabhängige Unterschiede. Während sich das Minutenvolumen weiblicher TASK1$^{-/-}$- bzw. Wildtypmäuse nicht unterschied, zeigten männliche TASK1$^{-/-}$-Tiere eine Mehratmung unter Normoxie, Hypoxie, Hyperkapnie und Isofluran. Die Zunahme des Minutenvolumens

basierte bei gleichen Atemfrequenzwerten auf einem durch den TASK1-Knockout vergrößerten Tidalvolumen.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass TASK1$^{-/-}$-Mäuse eine normale Chemorezeption aufwiesen. Die Sensitivität gegenüber O_2 und CO_2 blieb großteils erhalten. TASK1 ist in der Atmungsregulation somit ohne eine für das Überleben essentielle Funktion und sein Fehlen kann kompensiert werden. Durch den verzögerten Frequenzanstieg der TASK1$^{-/-}$-Tiere unter akuter Hypoxie ergaben sich aber Hinweise für eine Beteiligung von TASK1 an der peripheren Chemorezeption.

7. Literaturverzeichnis

1. Adler A, Cieslewicz G, and Irvin CG (2004) Unrestrained plethysmography is an unreliable measure of airway responsiveness in BALB/c and C57BL/6 mice. *J Appl Physiol,* **97,** 286-292.

2. Aller MI, Veale EL, Linden AM, Sandu C, Schwaninger M, Evans LJ, Korpi ER, Mathie A, Wisden W, and Brickley SG (2005) Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons. *J Neurosci,* **25,** 11455-11467.

3. Barbuti A, Ishii S, Shimizu T, Robinson RB, and Feinmark SJ (2002) Block of the background K(+) channel TASK-1 contributes to arrhythmogenic effects of platelet-activating factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* **282,** H2024-H2030.

4. Bates J, Irvin C, Brusasco V, Drazen J, Fredberg J, Loring S, Eidelman D, Ludwig M, Macklem P, Martin J, Milic-Emili J, Hantos Z, Hyatt R, Lai-Fook S, Leff A, Solway J, Lutchen K, Suki B, Mitzner W, Pare P, Pride N, and Sly P (2004) The use and misuse of Penh in animal models of lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol,* **31,** 373-374.

5. Bayliss DA, Talley EM, Sirois JE, and Lei Q (2001) TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive 'leak' K(+) channel expressed in brainstem respiratory neurons. *Respir Physiol,* **129,** 159-174.

6. Behan M, Zabka AG, Thomas CF, and Mitchell GS (2003) Sex steroid hormones and the neural control of breathing. *Respir Physiol Neurobiol,* **136,** 249-263.

7. Buckingham SD, Kidd JF, Law RJ, Franks CJ, and Sattelle DB (2005) Structure and function of two-pore-domain K+ channels: contributions from genetic model organisms. *Trends Pharmacol Sci,* **26,** 361-367.

8. Buckler KJ (1997) A novel oxygen-sensitive potassium current in rat carotid body type I cells. *J Physiol,* **498 (Pt 3),** 649-662.

9. Buckler KJ, Williams BA, and Honore E (2000) An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol,* **525 Pt 1,** 135-142.

10. Calhoun DA (2006) Aldosteronism and hypertension. *Clin J Am Soc Nephrol,* **1,** 1039-1045.

11. Czirjak G and Enyedi P (2002) Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J Biol Chem,* **277,** 5426-5432.

12. Czirjak G, Fischer T, Spat A, Lesage F, and Enyedi P (2000) TASK (TWIK-related acid-sensitive K+ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol Endocrinol,* **14,** 863-874.

13. Davies LA, Hu C, Guagliardo NA, Sen N, Chen X, Talley EM, Carey RM, Bayliss DA, and Barrett PQ (2008) TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **105,** 2203-2208.

14. Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, and MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K+ conduction and selectivity. *Science,* **280,** 69-77.

15. Duprat F, Lauritzen I, Patel A, and Honore E (2007) The TASK background K(2P) channels: chemo- and nutrient sensors. *Trends Neurosci,* **30,** 573-580.

16. Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C, and Lazdunski M (1997) TASK, a human background K+ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J,* **16,** 5464-5471.

17. Fardella CE, Pinto M, Mosso L, Gomez-Sanchez C, Jalil J, and Montero J (2001) Genetic study of patients with dexamethasone-suppressible aldosteronism without the chimeric CYP11B1/CYP11B2 gene. *J Clin Endocrinol Metab,* **86,** 4805-4807.

18. Goldsmith CA, Ning Y, Qin G, Imrich A, Lawrence J, Murthy GG, Catalano PJ, and Kobzik L (2002) Combined air pollution particle and ozone exposure increases airway responsiveness in mice. *Inhal Toxicol,* **14,** 325-347.

19. Goldstein SA, Bockenhauer D, O'Kelly I, and Zilberberg N (2001) Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci,* **2,** 175-184.

20. Gordon RD, Stowasser M, Klemm SA, and Tunny TJ (1995) Primary aldosteronism--some genetic, morphological, and biochemical aspects of subtypes. *Steroids,* **60,** 35-41.

21. Gurney A and Manoury B (2008) Two-pore potassium channels in the cardiovascular system. *Eur Biophys J*.

22. Gurney AM, Osipenko ON, MacMillan D, McFarlane KM, Tate RJ, and Kempsill FE (2003) Two-pore domain K channel, TASK-1, in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res,* **93,** 957-964.

23. Hartness ME, Lewis A, Searle GJ, O'Kelly I, Peers C, and Kemp PJ (2001) Combined antisense and pharmacological approaches implicate hTASK as an airway O(2) sensing K(+) channel. *J Biol Chem,* **276,** 26499-26508.

24. Heitzmann D, Derand R, Jungbauer S, Bandulik S, Sterner C, Schweda F, El Wakil A, Lalli E, Guy N, Mengual R, Reichold M, Tegtmeier I, Bendahhou S, Gomez-Sanchez CE, Aller MI, Wisden W, Weber A, Lesage F, Warth R, and Barhanin J (2008) Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. *EMBO J,* **27,** 179-187.

25. Heitzmann D, Grahammer F, von Hahn T, Schmitt-Graff A, Romeo E, Nitschke R, Gerlach U, Lang HJ, Verrey F, Barhanin J, and Warth R (2004) Heteromeric KCNE2/KCNQ1 potassium channels in the luminal membrane of gastric parietal cells. *J Physiol,* **561,** 547-557.

26. Heitzmann D and Warth R (2007) No potassium, no acid: K+ channels and gastric acid secretion. *Physiology (Bethesda),* **22,** 335-341.

27. Heitzmann D and Warth R (2008) Physiology and pathophysiology of potassium channels in gastrointestinal epithelia. *Physiol Rev,* **88,** 1119-1182.

28. Holmer SR, Kaissling B, Putnik K, Pfeifer M, Kramer BK, Riegger GA, and Kurtz A (1997) Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *J Hypertens,* **15,** 1471-1479.

29. Jenkinson DH (2006) Potassium channels--multiplicity and challenges. *Br J Pharmacol,* **147 Suppl 1,** S63-S71.

30. Jiang C, Rojas A, Wang R, and Wang X (2005) CO2 central chemosensitivity: why are there so many sensing molecules? *Respir Physiol Neurobiol,* **145,** 115-126.

31. Jones SA, Morton MJ, Hunter M, and Boyett MR (2002) Expression of TASK-1, a pH-sensitive twin-pore domain K(+) channel, in rat myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* **283,** H181-H185.

32. Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK, and Goldstein SA (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature,* **376,** 690-695.

33. Kim D, Cavanaugh EJ, Kim I, and Carroll J (2009) Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K+ channel in rat carotid body glomus cells. *J Physiol*.

34. Kim D, Fujita A, Horio Y, and Kurachi Y (1998) Cloning and functional expression of a novel cardiac two-pore background K+ channel (cTBAK-1). *Circ Res,* **82,** 513-518.

35. Kiyoshi H, Yamazaki D, Ohya S, Kitsukawa M, Muraki K, Saito SY, Ohizumi Y, and Imaizumi Y (2006) Molecular and electrophysiological characteristics of K+ conductance sensitive to acidic pH in aortic smooth muscle cells of WKY and SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* **291,** H2723-H2734.

36. Kunzelmann K (2005) Ion channels and cancer. *J Membr Biol,* **205,** 159-173.

37. Lahiri S and Forster RE (2003) CO2/H(+) sensing: peripheral and central chemoreception. *Int J Biochem Cell Biol,* **35,** 1413-1435.

38. Lahiri S, Roy A, Baby SM, Hoshi T, Semenza GL, and Prabhakar NR (2006) Oxygen sensing in the body. *Prog Biophys Mol Biol,* **91,** 249-286.

39. Lee YM, Kim BJ, Chun YS, So I, Choi H, Kim MS, and Park JW (2006) NOX4 as an oxygen sensor to regulate TASK-1 activity. *Cell Signal,* **18,** 499-507.

40. Lesage F (2003) Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology,* **44,** 1-7.

41. Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, and Barhanin J (1996) TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K+ channel with a novel structure. *EMBO J,* **15,** 1004-1011.

42. Lesage F, Lauritzen I, Duprat F, Reyes R, Fink M, Heurteaux C, and Lazdunski M (1997) The structure, function and distribution of the mouse TWIK-1 K+ channel. *FEBS Lett,* **402,** 28-32.

43. Lesage F and Lazdunski M (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol,* **279,** F793-F801.

44. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Gutkin M, Fallo F, Gill JR, Jr., Feld L, Ganguly A, Laidlaw JC, and . (1992) Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. *Nat Genet,* **2,** 66-74.

45. Linden AM, Aller MI, Leppa E, Vekovischeva O, Aitta-Aho T, Veale EL, Mathie A, Rosenberg P, Wisden W, and Korpi ER (2006) The in vivo contributions of TASK-1-containing channels to the actions of inhalation anesthetics, the alpha(2) adrenergic sedative dexmedetomidine, and cannabinoid agonists. *J Pharmacol Exp Ther,* **317,** 615-626.

46. Lopez-Barneo J, Lopez-Lopez JR, Urena J, and Gonzalez C (1988) Chemotransduction in the carotid body: K+ current modulated by PO2 in type I chemoreceptor cells. *Science,* **241,** 580-582.

47. Maingret F, Patel AJ, Lazdunski M, and Honore E (2001) The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K(+) channel TASK-1. *EMBO J,* **20,** 47-54.

48. Makhanova,N, Hagaman,J, Kim,HS, and Smithies,O (2008) Salt-sensitive blood pressure in mice with increased expression of aldosterone synthase. *Hypertension,* **51,** 134-140.

49. Medhurst AD, Rennie G, Chapman CG, Meadows H, Duckworth MD, Kelsell RE, Gloger II, and Pangalos MN (2001) Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res Mol Brain Res,* **86,** 101-114.

50. Miller C (2000) An overview of the potassium channel family. *Genome Biol,* **1,** REVIEWS0004.

51. Mulatero P, Veglio F, Pilon C, Rabbia F, Zocchi C, Limone P, Boscaro M, Sonino N, and Fallo F (1998) Diagnosis of glucocorticoid-remediable aldosteronism in primary aldosteronism: aldosterone response to dexamethasone and long polymerase chain reaction for chimeric gene. *J Clin Endocrinol Metab,* **83,** 2573-2575.

52. Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA, and Guyenet PG (2004) Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci,* **7,** 1360-1369.

53. Mulkey DK, Talley EM, Stornetta RL, Siegel AR, West GH, Chen X, Sen N, Mistry AM, Guyenet PG, and Bayliss DA (2007) TASK channels determine pH sensitivity in select respiratory neurons but do not contribute to central respiratory chemosensitivity. *J Neurosci,* **27,** 14049-14058.

54. Neubauer JA and Sunderram J (2004) Oxygen-sensing neurons in the central nervous system. *J Appl Physiol,* **96,** 367-374.

55. Nussberger J (2003) Investigating mineralocorticoid hypertension. *J Hypertens Suppl,* **21,** S25-S30.

56. O'Kelly I, Stephens RH, Peers C, and Kemp PJ (1999) Potential identification of the O2-sensitive K+ current in a human neuroepithelial body-derived cell line. *Am J Physiol,* **276,** L96-L104.

57. Olschewski A, Li Y, Tang B, Hanze J, Eul B, Bohle RM, Wilhelm J, Morty RE, Brau ME, Weir EK, Kwapiszewska G, Klepetko W, Seeger W, and Olschewski H (2006) Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res,* **98,** 1072-1080.

58. Pascoe L, Jeunemaitre X, Lebrethon MC, Curnow KM, Gomez-Sanchez CE, Gasc JM, Saez JM, and Corvol P (1995) Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism and adrenal tumors occurring in a single French pedigree. *J Clin Invest,* **96,** 2236-2246.

59. Patel AJ and Honore E (2001) Molecular physiology of oxygen-sensitive potassium channels. *Eur Respir J,* **18,** 221-227.

60. Patel AJ, Honore E, Lesage F, Fink M, Romey G, and Lazdunski M (1999) Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K+ channels. *Nat Neurosci,* **2,** 422-426.

61. Patel AJ and Lazdunski M (2004) The 2P-domain K+ channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Pflugers Arch,* **448,** 261-273.

62. Pauluhn J (2004) Comparative analysis of pulmonary irritation by measurements of Penh and protein in bronchoalveolar lavage fluid in brown Norway rats and Wistar rats exposed to irritant aerosols. *Inhal Toxicol,* **16,** 159-175.

63. Perez-Garcia MT, Lopez-Lopez JR, Riesco AM, Hoppe UC, Marban E, Gonzalez C, and Johns DC (2000b) Viral gene transfer of dominant-negative Kv4 construct

suppresses an O2-sensitive K+ current in chemoreceptor cells. *J Neurosci,* **20,** 5689-5695.

64. Perez-Garcia MT, Lopez-Lopez JR, Riesco AM, Hoppe UC, Marban E, Gonzalez C, and Johns DC (2000a) Viral gene transfer of dominant-negative Kv4 construct suppresses an O2-sensitive K+ current in chemoreceptor cells. *J Neurosci,* **20,** 5689-5695.

65. Petak F, Habre W, Donati YR, Hantos Z, and Barazzone-Argiroffo C (2001) Hyperoxia-induced changes in mouse lung mechanics: forced oscillations vs. barometric plethysmography. *J Appl Physiol,* **90,** 2221-2230.

66. Putzke C, Wemhoner K, Sachse FB, Rinne S, Schlichthorl G, Li XT, Jae L, Eckhardt I, Wischmeyer E, Wulf H, Preisig-Muller R, Daut J, and Decher N (2007) The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle. *Cardiovasc Res,* **75,** 59-68.

67. Rajan S, Preisig-Muller R, Wischmeyer E, Nehring R, Hanley PJ, Renigunta V, Musset B, Schlichthorl G, Derst C, Karschin A, and Daut J (2002) Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J Physiol,* **545,** 13-26.

68. Richter TA, Dvoryanchikov GA, Chaudhari N, and Roper SD (2004) Acid-sensitive two-pore domain potassium (K2P) channels in mouse taste buds. *J Neurophysiol,* **92,** 1928-1936.

69. Sand P, Anger A, and Rydqvist B (2004) Hypotonic stress activates an intermediate conductance K+ channel in human colonic crypt cells. *Acta Physiol Scand,* **182,** 361-368.

70. Sirois JE, Lei Q, Talley EM, Lynch C, III, and Bayliss DA (2000) The TASK-1 two-pore domain K+ channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics. *J Neurosci,* **20,** 6347-6354.

71. Spat A (2004) Glomerulosa cell--a unique sensor of extracellular K+ concentration. *Mol Cell Endocrinol,* **217,** 23-26.

72. Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D, and Bayliss DA (2001) Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci,* **21,** 7491-7505.

73. Tatsumi K (1999) [Effects of female hormones on respiratory and cardiovascular regulation]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi,* **37,** 359-367.

74. Trapp S, Aller MI, Wisden W, and Gourine AV (2008) A role for TASK-1 (KCNK3) channels in the chemosensory control of breathing. *J Neurosci,* **28,** 8844-8850.

75. Wang J, Zhang C, Li N, Su L, and Wang G (2008) Expression of TASK-1 in brainstem and the occurrence of central sleep apnea in rats. *Respir Physiol Neurobiol,* **161,** 23-28.

76. Washburn CP, Bayliss DA, and Guyenet PG (2003) Cardiorespiratory neurons of the rat ventrolateral medulla contain TASK-1 and TASK-3 channel mRNA. *Respir Physiol Neurobiol,* **138,** 19-35.

77. Weir EK, Lopez-Barneo J, Buckler KJ, and Archer SL (2005) Acute oxygen-sensing mechanisms. *N Engl J Med,* **353,** 2042-2055.

78. Weyand B, Warth R, Bleich M, Kerstan D, Nitschke R, and Greger R (1998) Hypertonic cell shrinkage reduces the K+ conductance of rat colonic crypts. *Pflugers Arch,* **436,** 227-232.

79. Williams BA and Buckler KJ (2004) Biophysical properties and metabolic regulation of a TASK-like potassium channel in rat carotid body type 1 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,* **286,** L221-L230.

80. Yamamoto Y, Kummer W, Atoji Y, and Suzuki Y (2002) TASK-1, TASK-2, TASK-3 and TRAAK immunoreactivities in the rat carotid body. *Brain Res,* **950,** 304-307.

81. Zeldin DC, Wohlford-Lenane C, Chulada P, Bradbury JA, Scarborough PE, Roggli V, Langenbach R, and Schwartz DA (2001) Airway inflammation and responsiveness in prostaglandin H synthase-deficient mice exposed to bacterial lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol,* **25,** 457-465.

8. Eigene Veröffentlichungen

8.1 Originalarbeiten

Heitzmann D, Derand R, **Jungbauer S**, Bandulik S, Sterner C, Schweda F, Elwakil AE, Lalli E, Guy N, Mengual R, Reichold M, Tegtmeier I, Bendahhou S, Gomez-Sanchez CE, Isabel AM, Wisden W, Weber A, Lesage F, Warth R, and Barhanin J

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

EMBO J., 27(1):179-87 (2008)

8.2 Kongressbeiträge

Jungbauer S, Heitzmann D, Thomas J, Tegtmaier I, Sterner C, Aller I, Wisden W, Barhanin J, Warth R

Effects of hypoxia on respiration of TASK1 potassium channel knockout mice

Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2007 in Hannover – Poster

9. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Jungbauer
Vorname:	Stefan
Geburtsdatum:	07.07.1982
Geburtsort:	Deggendorf
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Konfession:	römisch-katholisch

SCHULBILDUNG

1989-1993:	Grundschule Theodor-Eckert Deggendorf
1993-2002:	Comenius Gymnasium Deggendorf
Jun 2002:	Ende der Schulausbildung, Allgemeine Hochschulreife

ZIVILDIENST

2002-2003:	Zivildienst in der Asklepios Klinik Schaufling

STUDIUM

seit Okt 2003:	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
Sep 2005:	Bestehen des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
Jul 2006:	Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes
Aug 2008:	Beginn des Praktischen Jahres
1.Teritial:	Chirurgie im Klinikum Weiden und im Royal Hallamshire Hospital Sheffield/England
2. Tertial:	Orthopädie in der Asklepios Klinik Bad Abbach (Universität Regensburg) und im Kantonsspital St. Gallen/Schweiz
3. Tertial:	Innere Medizin im Universitätsklinikum Regensburg
Nov 2009:	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

PROMOTION

Aug 2006:	Beginn der experimentellen Doktorarbeit am Institut für Physiologie bei Prof. Dr. Warth an der Universität Regensburg, NWF III/VKL

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen fur Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Deggendorf, 03.06.2010

Stefan Jungbauer

11. Danksagung

Die Mitarbeit am Physiologischen Institut stellte eine interessante Abwechslung zum Alltag des Medizinstudiums dar und bot mir einen interessanten Einblick in die Forschung. Hierfür möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Richard Warth bedanken. Aufgrund seiner offenen Art und seinem Ideenreichtum herrschte im Labor immer eine produktive und freundliche Atmosphäre. Man fühlte sich stets als vollwertiges Mitglied der Arbeitsgruppe. Hervorheben möchte ich weiterhin, dass er stets am aktuellen Stand meiner Arbeit interessiert war und somit neben meinem direkten Betreuer entscheidend zum Gelingen beitrug.

Ein ganz besonders großes Dankeschön möchte ich meinem Betreuer PD Dr. Dirk Heitzmann aussprechen. Er hat mich mit großer Geduld in die technischen Finessen der Blutdruckmessung bzw. der Plethysmographie eingeführt. Mittlerweile hat er leider die Physiologie verlassen und ich möchte ihm hiermit viel Erfolg und Glück für die Zukunft in der Inneren Medizin wünschen.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Jacques Barhanin, der durch seine Aldosteronmessungen den Anstoß für einen Teil meiner Arbeit gegeben hat, und Herrn Prof. Dr. Frank Schweda, der die technische Ausrüstung für die Blutdruckmessungen zur Verfügung gestellt hat.

Das Plethysmographie-System wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von Dr. Jörg Thomas aus der Klinik für Anästhesiologie der Universität Ulm überlassen.

Für die Durchführung der thermographischen Messungen möchte ich Herrn. Prof. Dr.-Ing. Michael Elsner von der Fachhochschule Regensburg meinen Dank aussprechen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den "Damen des Hauses" Christina Sterner und Ines Tegtmeier für ihre zahlreichen Ratschläge und die netten Gespräche bedanken. Besonders erwähnen möchte ich die tatkräftige Unterstützung von Christina Sterner bei der Genotypisierung der Mäuse.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch an meine Mitdoktoranden Alex März und Doris Utz sowie an Sascha Bandulik und Markus Reichold, die beiden Letztgenannten besitzen mittlerweile schon die Doktorwürde, richten, ohne die es sicherlich nur halb so viel Spaß gemacht hätte.

Zuletzt möchte ich mich auch bei den vielen anderen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts bedanken, die auf verschiedenste Art und Weise zu dieser Arbeit ihren Beitrag geleistet haben.