

Aus dem Physiologischen Institut (Direktor: Prof. Dr. Thomas Baukrowitz)
der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel

**CHARAKTERISIERUNG DER WIRKUNG UND DES WIRKMECHANISMUS VON
PHARMAKOLOGISCHEN K_{2P} - KANALAGONISTEN.**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel

vorgelegt von

MARIE TEGTMEIER

aus Bremen

Kiel (2019)

1. Berichterstatter:

PROF. DR. THOMAS BAUKROWITZ

2. Berichterstatter:

PROF. DR. DR. INGOLF CASCORBI

Tag der mündlichen Prüfung:

06.03.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung.....	4
1.1 Geschichte der Elektrophysiologie	4
1.2 Physiologie der Kaliumkanäle.....	5
1.3 Familien der Kaliumkanäle	6
1.4 Elektrophysiologische Eigenschaften der K_{2P} - Kanäle	9
1.5 Überblick über die 15 Mitglieder der K_{2P} - Familie und deren Regulation.....	11
1.6 Pathophysiologische Beteiligung der K_{2P} - Kanäle.....	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Oozyten- Präparation und RNA- Injektion.....	19
2.2 In- vitro- RNA- Synthese und Mutagenese	21
2.3 Elektrophysiologische Messungen mit der Patch- Clamp- Technik	23
2.4 Datenaufnahme, statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung	27
2.5 Übersicht aller verwendeten Lösungen und Chemikalien	30
3. Ergebnisse: Charakterisierung der Wirkung und des Wirkmechanismus von pharmakologischen K_{2P} - Kanalagonisten	32
3.1 Untersuchung des TREK- 1- Aktivators BL- 1249 hinsichtlich seines Wirkspektrums in der Familie der K_{2P} - Kanäle	34
3.1.1 TREK- Subfamilie.....	35
3.1.2 hTALK- 2.....	37
3.1.3 hTRAAK.....	38
3.1.4 hTHIK- 1	38
3.1.5 Zusammenfassender Vergleich derjenigen K_{2P} - Kanäle, auf welche BL- 1249 einen agonistischen Effekt zeigt.....	38
3.1.6 hTASK- Subfamilie	39
3.1.7 hTRESK.....	39
3.2 Charakterisierung der Wirkung weiterer Pharmaka an ausgewählten K_{2P} -Kanälen	40
3.2.1 2- APB	40
3.2.2 DPBA.....	41
3.2.3 Drofenin.....	41
3.2.4 Riluzol und 3-(3,6-Dichloro-carbazol-9-yl)-propane-1,2-diol	41
3.3 Aufklärung des Wirkmechanismus von BL-1249	42
3.3.1 BL- 1249- Aktivierung des N- und C- terminal trunkierten hTREK- 2	44
3.3.2 Konkurrenz zwischen BL- 1249 und verschiedenen Kanalblockern.....	44
3.3.2.1 Konkurrenz zwischen BL- 1249 und TPA im rTREK- 1- Kanal	44

3.3.2.2	Kompetition zwischen BL- 1249 und Norfluoxetin.....	44
3.3.3	Cysteinmutationsscan zur Identifizierung der BL- 1249- Bindungsstelle	46
3.3.3.1	Lokalisation der BL- 1249- Bindungsstelle im Porenbereich von rTREK- 1	46
3.3.3.2	Einfluss der L304C- Mutation im rTREK- 1 auf die 2- APB- Aktivierung	47
4.	Diskussion.....	48
4.1	BL- 1249: Aufklärung von Bindungsstelle und Wirkmechanismus.....	48
4.2	Mechanismen der Regulation von Ionenkanälen durch Pharmakabindung	50
4.2.1	2- APB	50
4.2.2	Norfluoxetin	50
4.3	Wirkmechanismus von BL- 1249	51
5.	Schlusswort.....	53
6.	Zusammenfassung.....	54
7.	Literaturverzeichnis.....	57
8.	Danksagung	64

Abkürzungsverzeichnis

2- APB	2- Aminoethoxydiphenylborat
Abb.	Abbildung
AKAP150	Ankerprotein 150 der Proteinkinase A
ATP	Adenosintriphosphat
BL- 1249	(5,6,7,8-Tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl]-amin
C (innen bzw. außen)	Ionenkonzentration im Intra- bzw. Extrazellulärraum
C- Terminus	Proteinende, welches eine Carboxylgruppe aufweist
CHO	Chinese Hamster Ovary – immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters
CoA	Coenzym A
COS- 7	Fibroblasten- Zelllinie aus Nierengewebe der Grünen Meerkatze
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBA	Diphenylboranyloxy-(diphenyl)boran
DRG	Dorsal Root Ganglia
$E_{(K^+)}$	Gleichgewichtspotenzial für Kaliumionen
$E_{(M)}$	Membranpotenzial
EC ₅₀	Mittlere effektive Wirkstoffkonzentration, die zu einem halbmaximalen aktivierenden Effekt führt
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N,N',N'-tetraessigsäure

F	Faraday- Konstante ($9,65 \cdot 10^4 \text{ A} \cdot \text{s} \cdot \text{mol}^{-1}$)
GHK	Goldman- Hodgkin- Katz- Gleichung
HEK293	Humane embryonale Nierenzelllinie 293
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinylethansulfonsäure
IC ₅₀	Mittlere effektive Wirkstoffkonzentration, die zu einem halbmaximalen inhibitorischen Effekt führt
K _{2P}	Zwei- Porendomänen- Kaliumkanäle
K _{Ca2+}	Kalzium- aktivierte- Kaliumkanäle
KcsA	Streptomyces lividans- Kaliumkanal
K _{ir}	Einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle (eng.: inwardly rectifying channels)
K _v	Spannungsabhängigen Kaliumkanäle (eng.: voltage- gated channels)
M	Mittelwert
Mtap2	Microtubule- associated protein 2
N	Anzahl
N- Terminus	Proteinende, welches eine Aminogruppe aufweist
nA	Nanoampere (10^{-9} Ampere)
Nav	Spannungsabhängigen Natriumkanäle (eng.: voltage- gated channels)
NFX	Norfluoxetin
NMDG ⁺	N-Methyl-D-glucamin
NO	Stickstoffmonoxid
P	Porendomäne

$P_{(a \text{ bzw. } b)}$	Permeabilität der Membran für Ion a bzw. b
P_0	Offenwahrscheinlichkeit
pA	Pikoampere (10^{-12} Ampere)
R	allgemeine Gaskonstante ($8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$)
RNA	Ribonukleinsäure
SD	(Standard Deviation)- Standardabweichung
SE	(Standard Error)- Standardfehler
SSRI	Selektiver Serotonin- Wiederaufnahmehemmer
TM	Transmembrandomäne
T	Temperatur in Kelvin ($0^\circ\text{C} \triangleq 273,15 \text{ K}$; hier bei 37°C)
TALK	TWIK- related alkaline pH- activated K^+ - Kanal
TASK	TWIK- related acid sensing K^+ - Kanal
TPA	Tetrapentylammoniumbromid
THIK	Halothane- inhibited K^+ - Kanal
TRAAK	TWIK- related arachidonic acid- stimulated K^+ - Kanal
TREK	TWIK- related K^+ - Kanal
TRESK	TWIK- related spinal cord K^+ -Kanal
TWIK	Weak inward rectifying K^+ -Kanal
WT	Wildtyp
$z_{(x)}$	Valenzzahl des Ions (bspw. $\text{K}^+ \triangleq +1$)

1. Einleitung

1.1 Geschichte der Elektrophysiologie

Die Elektrophysiologie stellt einen Teilbereich der Neurophysiologie dar, welcher sich mit der elektrochemischen Signaltransduktion befasst. Unterschieden wird einerseits zwischen klinisch- neurologischen Untersuchungen, wie beispielsweise der Messung evozierter Potentiale, Elektroenzephalographien, -neurographien oder -myographien und andererseits der experimentellen Elektrophysiologie, welche sich Methoden, wie Multielektrodenarrays, spannungsabhängige Farbstoffe oder die in dieser Arbeit überwiegend verwendete Patch-Clamp- Technik zu Nutze macht.

Ziele stellen unter anderem die Erforschung von Membranpotentialen, Ionenströmen und die Charakterisierung von Membranproteinen und ihrer Wirkmechanismen dar.

Schon in den 1660er Jahren wurde an Froschmuskelfasern eine auf mechanische Irritation folgende Muskelkontraktion beschrieben (Cobb, 2002, Maingret et al., 2000), doch erst im 18. Jahrhundert stellte Isaac Newton die Hypothese der elektrischen Signalübertragung auf (Sir Isaac Newton). Hermann von Helmholtz bestätigte später durch Nerv- Muskel- Präparationen diese Theorie (Helmholtz, 1850, Verkhratsky et al., 2006).

1868 gelangen Julius Bernstein die ersten Messungen eines Aktionspotentials (Seyfarth, 2006). Auf diesen Erkenntnissen basierte die von Kenneth Cole Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelte Spannungsklemme, das „voltage- clamp“, wobei eine als elektrischer Schaltkreis verstandene Zelle durch zwei Elektroden auf einem bestimmten Membranpotential gehalten wird (eng.: voltage- Strom; (to) clamp- (fest-) klemmen) (Cole, 1979). Mithilfe dieser Technik erforschten Andrew Huxley und Alan Hodgkin an Riesentintenfisch- Axonen erstmals Aktionspotenziale.

Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelten auf diesen ersten elektrophysiologischen Grundlagen schließlich die Patch- Clamp- Technik (Neher and Sakmann, 1976, Hamill et al., 1981). Diese Methode ermöglicht die Untersuchung von Ionenkanälen in einem durch eine Glaspipette elektrisch isoliertem Membranpatch (eng.: patch- Flicker).

Die Patch- Clamp- Technik stellt seitdem den Goldstandard zur biophysikalischen Untersuchung von Ionenkanälen dar. Neher und Sakman wurden hierfür 1991 mit dem Nobelpreis in Physiologie oder Medizin ausgezeichnet.

1.2 Physiologie der Kaliumkanäle

Die Zellmembran stellt sich als eine jede Zelle umgebende Lipiddoppelschicht von 6- 8 nm dar, welche Intra- und Extrazellulärraum voneinander trennt und vorwiegend aus amphiphilen Phospho- und Sphingolipiden sowie Cholesterin aufgebaut ist. Durch ihre Hydrophobizität können nur sehr kleine Moleküle, wie beispielsweise Gase und lipophile Substanzen die Membran überwinden, während sie eine Barriere für hydrophile Moleküle und Ionen bildet.

Die Zellmembran enthält zudem Proteine, die unter anderem die Kommunikation und Substanztausch zwischen Intrazellulär- und Extrazellulärraum ermöglichen. Diese Funktion wird von integralen Transmembranproteinen übernommen. Dazu werden aktiv transportierende Ionenpumpen, die Diffusion durch die Zellmembran erleichternde Carrierproteine und Ionenkanäle gezählt. Ionenkanäle weisen die höchste Ionenflussrate (10^6 - 10^8 Ionen pro Sekunde) im Vergleich zu Co- Transportern (10^2 - 10^4 /s) und Ionenpumpen (10^0 - 10^2 /s) auf (Choe, 2002).

Kaliumkanäle bilden die vielfältigste und heterogenste Gruppe aller Ionenkanäle und sind ubiquitär im Menschen in erregbaren und nicht erregbaren Zellen exprimiert. Im Interstitium liegt die Kaliumkonzentration circa um den Faktor 40 niedriger als in der Zelle (4 bzw. 155 $\text{mmol}_{(\text{K}^+)}/\text{kg}_{(\text{H}_2\text{O})}$).

Das aus dieser intra- und extrazellulär ungleichen Ionenverteilung entstehende Kaliumgleichgewichtspotenzial über eine ausschließlich kaliumselektive Membran ($E_{(\text{K}^+)}$) nach Nernst liegt bei -98 mV. Das Ionengleichgewichtspotenzial berechnet sich aus der sogenannten Nernst- Gleichung, die wie folgt lautet:

$$E(x) = \frac{R \cdot T}{F \cdot z(x)} \cdot \ln \frac{c[\text{außen}]}{c[\text{innen}]}$$

R= allg. Gaskonstante ($8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

T= Temperatur in Kelvin ($0^\circ\text{C} \triangleq 273,15 \text{ K}$; hier bei 37°C)

F= Faraday- Konstante ($9,65 \cdot 10^4 \text{ A} \cdot \text{s} \cdot \text{mol}^{-1}$)

$z_{(x)}$ = Ladungszahl des Ions ($\text{K}^+ \triangleq +1$)

C (innen bzw. außen)= Ionenkonzentration im Intra- bzw. Extrazellulärraum

Bei einer Spannung von -98 mV findet im Modell einer Membran mit ausschließlich offenen Kaliumkanälen kein Nettoionenfluss mehr statt, da die elektrische Potentialdifferenz und die chemische Triebkraft, welche aus dem Ungleichgewicht der Ionenverteilung resultiert, mit gleicher Kraft genau entgegengesetzt wirken (Hille, 2001, Goldstein et al., 2001).

Die hohe physiologische Leitfähigkeit der Kaliumkanäle bewirkt in humanen Sinnes-, Nerven- und Muskelzellen ein negatives Ruhemembranpotenzial von circa -70 mV; das Kaliumgleichgewichtspotenzial wird durch den Einfluss anderer permeierender Ionen, wie Chlorid, Natrium oder Kalzium allerdings nicht erreicht (Bayliss and Barrett, 2008).

Das Membranpotenzial ($E_{(M)}$) unter Berücksichtigung mehrerer Ionen wird durch die Goldman- Hodgkin- Katz- Gleichung (GHK) beschrieben. Anders als die Nernst- Gleichung wird hier ein stationärer Zustand ohne Ionenfluss angenommen:

$$E_{(M)} = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{(P(a) \cdot c[a(\text{außen})] + P(b) \cdot c[b(\text{außen})])}{(P(a) \cdot c[a(\text{innen})] + P(b) \cdot c[b(\text{innen})])}$$

R= allg. Gaskonstante ($8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

T= Temperatur in Kelvin ($0^\circ\text{C} \triangleq 273,15 \text{ K}$; hier bei 37°C)

F= Faraday- Konstante ($9,65 \cdot 10^4 \text{ A} \cdot \text{s} \cdot \text{mol}^{-1}$)

$P_{(a \text{ bzw. } b)}$ = Permeabilität der Membran für Ion a bzw. b

$c_{[a \text{ bzw. } b]}$ = Ionenkonzentration im Extra- bzw. Intrazellulärraum

1.3 Familien der Kaliumkanäle

Die Klasse der kaliumselektiven Ionenkanäle wird in vier Familien unterteilt (Vgl. Abb. 1, (A)): spannungsabhängige K_v - Kanäle, einwärts gleichrichtende K_{ir} - Kanäle, Kalzium- aktivierte $K_{Ca^{2+}}$ - Kanäle und die Zwei- Porendomänen- Kaliumkanäle (K_{2P} - Kanäle). Über 80 für Kaliumkanäle codierende Gene sind bei Säugetieren bekannt. Die Diversität wird durch alternatives mRNA-Spleißen, posttranslationale Modifikation oder Heteromer- Bildung erweitert.

Der erste Ionenkanal, bei welchem die Kristallstruktur aufgelöst wurde, war 1998 der KscA- Kaliumkanal vom *Streptomyces lividans* (Doyle et al., 1998).

Alle bekannten Kaliumkanäle formieren sich aus mehreren gleichen oder verschiedenen α - Untereinheiten, wodurch sich ein homo- oder heterooligomerer Kanal ausbildet. Die α -

Untereinheiten sind aus unterschiedlich vielen Transmembran- (TM) und Porendomänen (P) aufgebaut.

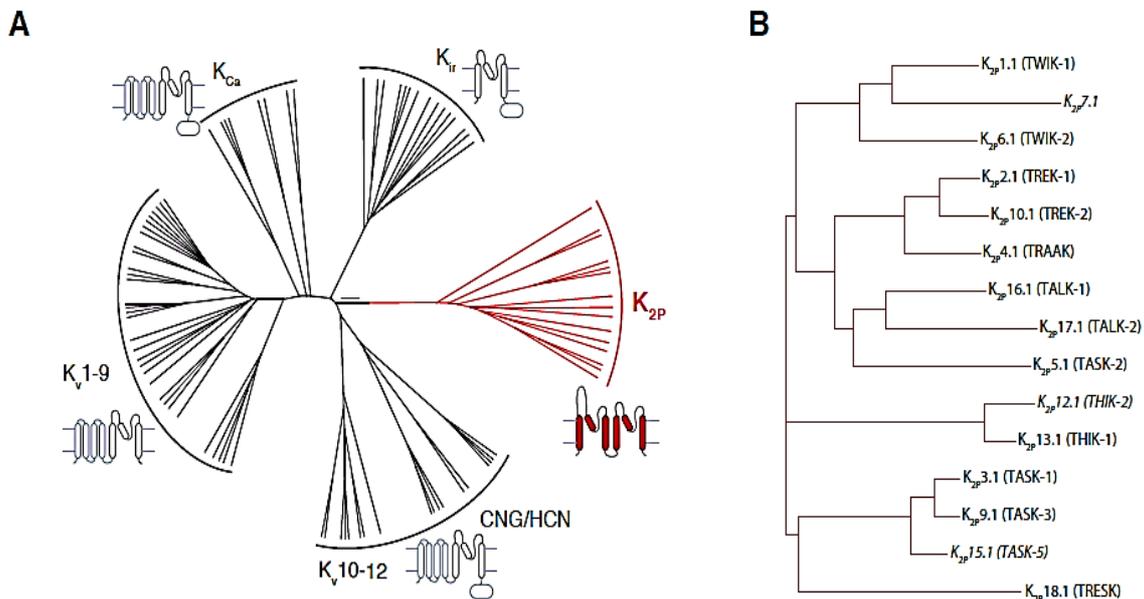


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der kaliumleitenden Ionenkanäle und der K_{2P} - Familie. (A) Es sind die Verwandtschaftsbeziehungen von einwärts gleichrichtenden (K_{ir}), Ca^{2+} - aktivierten ($K_{Ca^{2+}}$), spannungsregulierten (K_v), durch zyklische Nukleotide aktivierbaren (CNG/ HCN) und Zwei- Porendomänen- Kaliumkanälen (K_{2P}) dargestellt. Eine exemplarische Untereinheit ist für jede Familie vom N- zum C- Terminus dargestellt. Rot hervorgehoben ist die Familie der K_{2P} - Kanäle, welche als einzige Familie zwei Porendomänen in einer Untereinheit aufweisen. **(B)** Das Dendrogramm verdeutlicht die Verwandtschaftsbeziehungen der fünfzehn K_{2P} - Kanäle untereinander. Diese lassen sich in sechs Subfamilien mit unterschiedlich vielen Mitgliedern einteilen. KCNK8, KCNK11 und KCNK14 existieren nicht (Brohawn et al., 2012).

K_v - Kanäle

Die spannungsabhängigen K_v - Kanäle (eng.: voltage- gated channels) setzen sich aus vier α - Untereinheiten zusammen, welche aus sechs Transmembran- und einer Porendomäne zwischen TM5 und TM6 bestehen (1P6TM). Diese größte Familie der Kaliumkanäle teilt sich in 12 Subfamilien, die insgesamt von 40 Genen codiert werden (Gutman et al., 2005). Sie werden durch Änderungen der Membranspannung reguliert.

Bei Depolarisation wird ein aus positiv geladenen Aminosäuren aufgebauter Spannungssensor in TM4 in Richtung des Extrazellulärraums gezogen. Diese Konformationsänderung bewirkt eine mechanisch gekoppelte Kanalöffnung (Cha et al., 1999). Damit trägt die K_v - Familie einen wichtigen Anteil zur Signalweiterleitung über Aktionspotenziale bei.

K_{ir}- Kanäle

Ebenfalls Tetramere bilden die einwärts gleichrichtenden K_{ir}- Kanäle (eng.: inwardly rectifying channels), deren α - Untereinheiten aus zwei Transmembrandomänen sowie einer verbindenden Porendomäne bestehen (1P2TM).

Bei Spannungen positiv vom Umkehrpotential wird der tetramere Kanal durch positiv geladene Ionen, wie Magnesium oder endogene Polyamine, wie Spermidin, unidirektional blockiert (Matsuda et al., 1987, Ficker et al., 1994). Das Umkehrpotential ist als Membranpotential ohne elektrischen Nettoionenfluss definiert. Durch Einwärtsströme bei Membranpotenzialen negativ des Umkehrpotenzials wird durch K_{ir}- Kanäle das Ruhemembranpotenzial stabilisiert ohne Depolarisationen entgegenzuwirken. Sie spielen damit ebenfalls eine wesentliche Rolle für die elektrische Erregbarkeit von Membranen.

K_{Ca2+}- Kanäle

Bei Kalzium- aktivierten- Kaliumkanälen werden zwei Gruppen unterschieden: Einerseits die „small“-, sowie „intermediate conductance“- Kanäle, welche spannungsunabhängig bei niedrigen Kalzium- Konzentrationen aktiviert werden und deren α - Untereinheiten aus sechs Transmembrandomänen aufgebaut sind und andererseits „big conductance“- Kanäle, deren Untereinheiten aus sieben Transmembrandomänen bestehen. „Big conductance“- Kanäle sind teilweise mit Kalziumkanälen colokalisiert. (Wei et al., 2005, Maljevic and Lerche, 2013).

K_{2p}- Kaliumkanäle

Die Familie der Zwei- Porendomänen- Kaliumkanäle umfasst beim Menschen fünfzehn Mitglieder, die sich nach strukturellen und funktionellen Aspekten in sechs Familien aufteilen (Vgl. Abb. 1, (B)); der TWIK- 1- Kanal wurde 1996 als Prototyp der K_{2p}- Kanäle entdeckt (Lesage et al., 1996a, Fink et al., 1996).

K_{2p}- Kanäle sind die zuletzt identifizierte Gruppe der Kaliumkanäle; ihr Name beschreibt den Aufbau der α - Untereinheiten (Vgl. Abb. 2) aus zwei porenbildenden Domänen und vier Transmembrandomänen (2P4TM). Um einen funktionellen Kanal zu erhalten, assemblieren die Untereinheiten zu Dimeren und nicht wie K_v- oder K_{ir}- Kanälen zu Tetrameren. Die insgesamt vier Porendomänen bilden die pseudotetramere kaliumselektive Kanalpore (Lesage et al., 1996b). Die hochkonservierte Threonin- (X)- Glycin- (X)- Glycin- Aminosäuresequenz in

der Pore bildet den sogenannten Selektivitätsfilter für Kaliumionen (Doyle et al., 1998, Vivier et al., 2015). Der Amino- (N-) und Carboxy- (C-) Terminus liegen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran. Eine weitere Besonderheit ist eine coiled-coiled cap- Struktur zwischen dem TM1- und P1- Segment, die mit der gleichen Struktur der zweiten Untereinheit über Disulfidbrücken zwischen Cysteinen interagiert. Zwischen TM2 und TM4 zeigten analysierte Kristallstrukturen der Kanäle eine laterale Fenestrierung, die eine Verbindung zwischen der Membran und Kavität schafft (Renigunta et al., 2015, Brohawn et al., 2012).

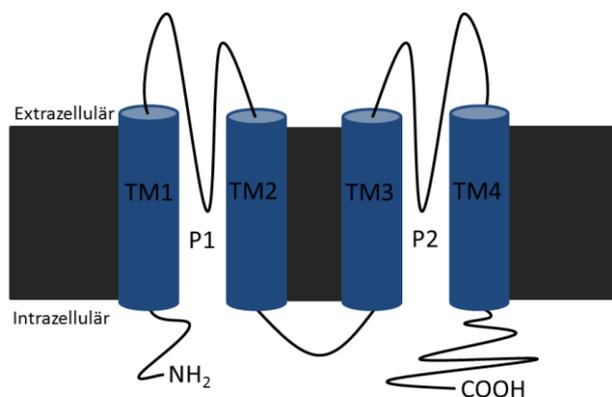


Abb. 2: Schematische Abbildung einer K₂P- Kanal-Untereinheit in der Zellmembran. Die vier Transmembrandomänen (TM1- TM4) sind in blau markiert. Zwischen TM1 und TM2, sowie TM3 und TM4 sind die zwei charakteristischen porenbildenden Domänen (P1, P2) lokalisiert. Auf der intrazellulären Membranseite sind der Amino- und Carboxyterminus angedeutet. Die Länge der intrazellulären Reste variiert kanalabhängig.

1.4 Elektrophysiologische Eigenschaften der K₂P- Kanäle

Elektrophysiologisch wurden die K₂P- Kanäle lange als unregulierte lecke Hintergrundkanäle als molekulares Korrelat zur hohen Kaliumleitfähigkeit der Zellmembran angesehen. Ideale Hintergrundkanäle folgen der Goldman- Hodgkin- Katz- Gleichung. Sie weisen keine spannungs- oder zeitabhängige Komponente auf und ihre Offenwahrscheinlichkeit (P_0) variiert nicht bei verschiedenen Membranpotentialen. Eine aktuelle Arbeit zeigt jedoch, dass die meisten K₂P- Kanäle ein spannungsabhängiges Schaltverhalten besitzen, so dass die Einordnung der K₂P- Kanäle als Leckkanäle revidiert werden muss (Schewe et al.). Früher wurde die starke Auswärts- Rektifizierung der K₂P- Kanäle dem physiologisch asymmetrischen Kaliumgradienten zugeschrieben (Goldstein et al., 2001).

Der prototypische TWIK- 1 verhält sich als einziger K₂P- Kanal wie ein klassischer, idealer Hintergrundkanal, während alle anderen K₂P- Kanäle eine deutliche Auswärts- Rektifizierung mit Spannungs- und Zeitabhängigkeit zeigen. Diese kann durch Mutation der hochkonservierten Threonine im Selektivitätsfilter aufgehoben werden, was deren grundlegende Bedeutung im Spannungsgating (eng.: gating- Steuerung), also der spannungs- bzw. konzentrationsgradientenabhängigen Regulation beweist. Es wurde gezeigt, dass dieses

sogenannte Ion Flux- Gating durch die Verschiebung von drei bis vier Kaliumionen im elektrischen Feld des Selektivitätsfilters hervorgerufen wird (Vgl. Abb. 3). Auswärtsströme stabilisieren den konduktiven Zustand des Selektivitätsfilters, woraus eine Auswärtsgleichrichtung der meisten K_{2P} - Kanäle resultiert. Bei Einwärtsströmen von Kalium kollabiert der Selektivitätsfilter. Dieser Effekt kann durch physiologische Aktivierung beispielsweise durch Arachidonsäure aufgehoben werden. Der Kanal wird dadurch in einen lecken Hintergrundkanal transformiert (Vivier et al., 2015).

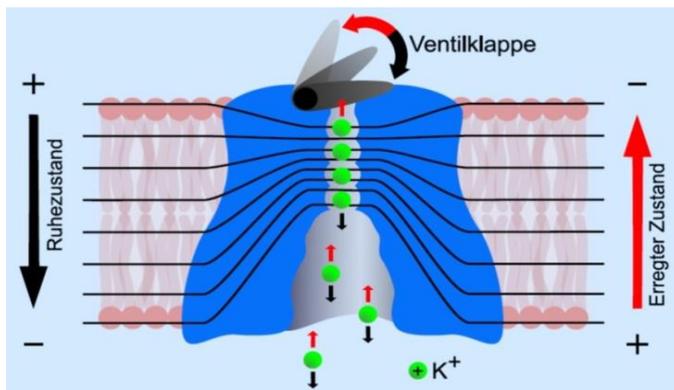


Abb. 3: Cartoon zur Öffnung des Selektivitätsfilter-Gates durch den Ion Flux-Mechanismus. Die auswärts strömenden Kaliumionen stabilisieren den leitenden Zustand des Kanals. Bei Einwärtsströmen kollabiert der Filter nach dem Prinzip eines Rückschlagventils (Abbildung übernommen aus Vivier et al., 2015).

Der Übertritt eines Kaliumions über die Zellmembran durch einen K_{2P} - Kanal stellt sich folgendermaßen dar:

Die Kaliumionen gelangen zunächst durch den intrazellulär gelegenen Poreneingang in die Kavität des Kanalproteins. Bei K_{2P} - Kanälen wird im Vergleich zu K_V - oder K_{ir} - Kanälen kein modulierender Einfluss des Poreneingangs auf das Schaltverhalten angenommen. Der Kavität schließt sich der vier Ionenbindungsstellen aufweisende Selektivitätsfilter an, wo die Kaliumionen dehydratisiert werden. Die Koordination der Kaliumionen wird von den Sauerstoffatomen der Carbonylverbindungen der Porendomänen übernommen. Der Selektivitätsfilter stellt in K_{2P} - Kanälen die einzige Struktur dar, welche das Schaltverhalten beeinflusst. Anschließend erreichen die Ionen den Extrazellulärraum (Piechotta et al., 2011, Kuang et al., 2015).

Paradoxe Weise verhält sich der prototypische TWIK- Kanal als einziges Mitglied der K_{2P} - Familie wie ein klassischer Leckkanal ohne Auswärtsrektifizierung. Im Unterschied zu den vorherig diskutierten Regulationsmechanismen sind die Liganden keine Moleküle, sondern die Kaliumionen selbst. Das Ion Flux- Gating unterliegt allerdings einer Regulation durch verschiedene physiologische Aktivatormoleküle. Wird ein K_{2P} - Kanal aktiviert, findet wie oben

beschrieben die Transformation in einen leeren Hintergrundskanal statt. Die Interaktion zwischen Arachidonsäure und dem Selektivitätsfilter ist noch nicht mechanistisch aufgeklärt.

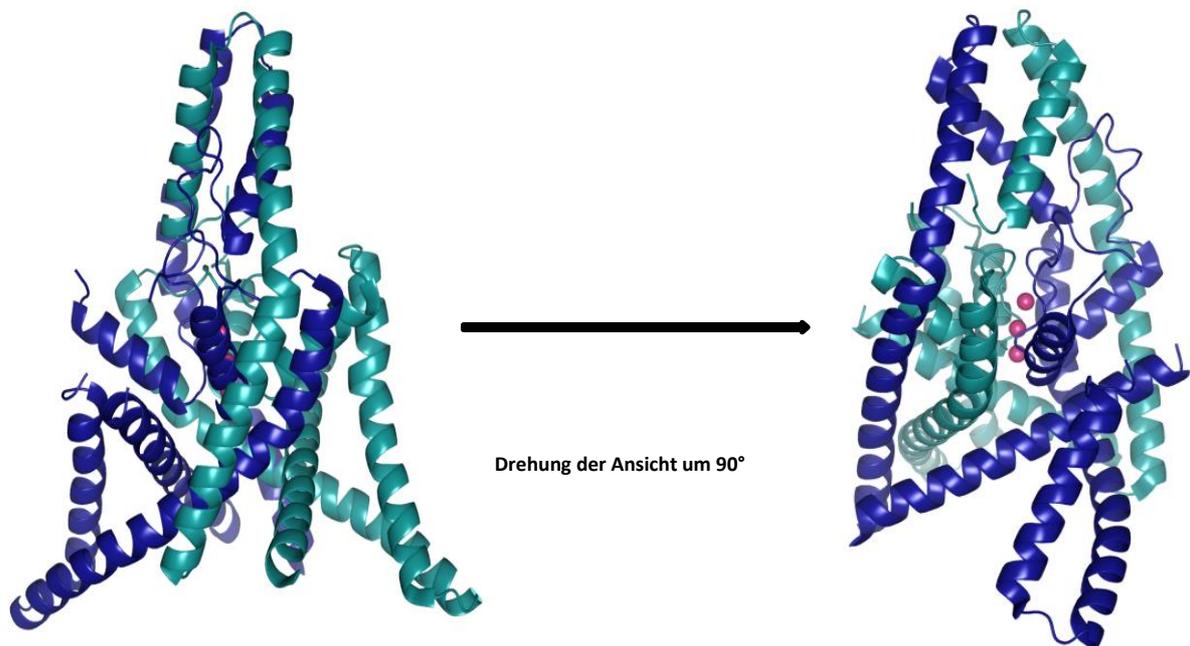


Abb. 4: Darstellung der Kristallstruktur eines K₂P- Kanals am Beispiel des TREK- 1- Kanals. Die Untereinheiten des dimeren Kanals sind in blau bzw. türkis eingefärbt. Die extrazelluläre coiled- coiled cap- Struktur des Kanals ist nach oben ausgerichtet, während die intrazellulär lokalisierten Reste auf der Abbildung nach unten weisen. Drei Kaliumionen (pinke Kugeln) sind im Selektivitätsfilter in ihrer Koordination im Selektivitätsfilter gezeigt. In der um 90° gedrehten Ansicht verläuft der Blick auf die Kaliumionen durch die laterale Fenestrierung. PDB-Datei: 4TWK; bearbeitet mit PyMol_molecular_visualization

1.5 Überblick über die 15 Mitglieder der K₂P- Familie und deren Regulation

Insgesamt sind die K₂P- Kanäle einer strengen polymodalen Regulation unterworfen. So beeinflussen physikalische Parameter wie der pH- Wert, die Temperatur oder Membrandehnung, aber auch intrazelluläre Botenstoffe aus Signalkaskaden, Membranlipiden oder diverse Pharmaka die Offenwahrscheinlichkeit und damit den Aktivierungszustand. Diese Beeinflussung wird durch Interaktionen mit dem Kanal an unterschiedlichen Bindungsstellen über diverse Aktivierungsmechanismen bewirkt (Honore, 2007, Feliciangeli et al., 2015).

Die K₂P- Kanäle sind ubiquitär exprimiert, weisen jedoch selbst innerhalb einer Kanalsubfamilie stark heterogene Expressionsmuster im menschlichen Organismus auf. Genaue Kenntnisse über kanalspezifische Expressionsmuster und Regulationen sind Voraussetzung, um ein Verständnis für den Einfluss der K₂P- Familie auf den menschlichen Körper und dessen Prozesse zu erlangen.

Im Folgenden wird ein Überblick über die 15 Mitglieder der sechs K_{2P} - Subfamilien und ihre individuelle Regulation gegeben:

TWIK („Tandem of Pore Domains in a **W**eak **I**nward **R**ectifying **K**⁺- channel“):

Zur Familie der schwach einwärtsrichtenden Kanäle werden TWIK- 1 (KCNK1), TWIK- 2 (KCNK6) und KCNK7 gezählt, wovon KCNK7 noch nicht als funktioneller Ionenkanal nachgewiesen werden konnte. TWIK-1 und -2 zeigen zwar sehr kleine, aber messbare Ionenströme in Froschoozyten. Für TWIK- 1 konnte eine Isoleucin- Repeat- Sequenz identifiziert werden, die eine Retention des Kanals im endoplasmatischen Retikulum bewirkt, was die geringe Expression auf der Zellmembran der Froschoozyten erklärt (Bichet et al., 2015). KCNK7 weist als Besonderheit C- terminal ein sogenanntes EF- Handmotiv auf, welches potentiell eine Ca^{2+} - Bindungsdomäne darstellen könnte, sowie eine Glycin- Leucin- Glutamat- Sequenz im Selektivitätsfilter, anstatt der bei allen anderen K_{2P} - Kanälen hochkonservierten Threonin- (X)- Glycin- (X)- Glycin- Sequenz. (Salinas et al., 1999).

TWIK- 1 wird unter anderem durch Veränderungen des intrazellulären pH- Werts, Barium, das Antiarrhythmikum Quinidin sowie durch die Proteinkinase C reguliert (Lesage et al., 1996a). TWIK- 1 ist in der humanen Niere, Lunge, Gehirn, Plazenta, dem vestibulo- chochleären System und Herzen exprimiert (Lesage et al., 1996a, Chen and Davis, 2006, Ellinghaus et al., 2005).

TREK („TWIK- **R**elated **K**⁺- channel“) und **TRAAK** (“TWIK- Related **A**rachidonic **A**cid activated **K**⁺- channel“):

TREK- 1 (KCNK2), TREK- 2 (KCNK10) und TRAAK (KCNK4) gehören einer sehr vielfältigen Subfamilie an. Die Diversität resultiert aus alternativen Spleißvarianten und Initiationsanfängen (Simkin et al., 2008). Diese Subfamilie zeigt, wie in der auf TREK- 1 und -2 bezogenen Abbildung 5 auf der nächsten Seite ersichtlich, eine vielfältige und polymodale Regulation durch physiologische und pharmakologische Mediatoren. Ein gemeinsames Merkmal dieser Familie stellt die Mechanoaktivierung dar. Osmotische Zellschwellung oder - schrumpfung, im Zellverbund wirkende Scherkräfte, eine Veränderungen der Membrankurvatur aufgrund von Inkorporation lipophiler Verbindungen oder mechanischer Druck auf die Zellmembran beeinflussen die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle. Eine entscheidende Rolle bei der Übertragung der Mechanoaktivierung nimmt der C- Terminus ein. Über die T4- Domäne leitet dieser die Aktivierung zum Selektivitätsfilter weiter (Maingret et

al., 2000, Chemin et al., 2005, Maingret et al., 1999). Diese Subfamilie wird außerdem durch diverse Lipidverbindungen, wie Arachidonsäure, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, Lysophospholipide und verschiedene Membranlipide reguliert. Des Weiteren üben auch die Temperatur oder Pharmaka wie beispielsweise das Benzothiazol Riluzol, das zur Behandlung der amyotrophen Lateralsklerose eingesetzt wird, einen Einfluss aus (Kim et al., 1995, Kang et al., 2005, Fink et al., 1998).

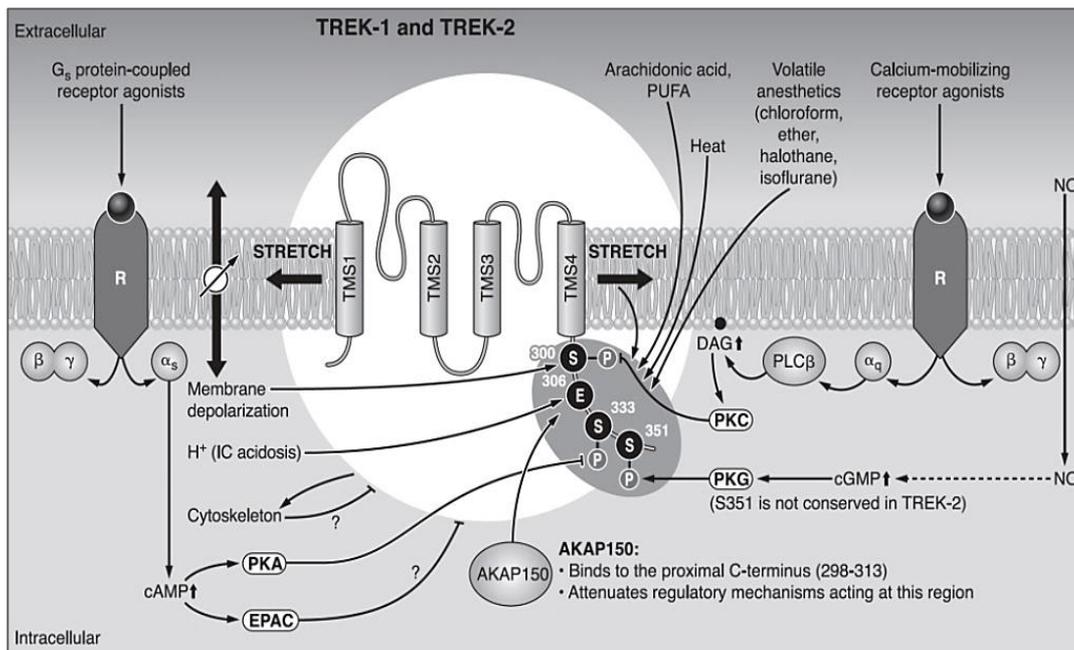


Abb. 5: Schaubild der komplexen multimodalen Regulation vom TREK- 1- und TREK- 2- Kanal. Diese K_{2P} -Kanäle sind auf vielfältige Weise reguliert. Physikalische Stimuli, wie Temperatur oder mechanischer Zug, aber auch chemische Einwirkungen durch intrazelluläre Azidose bewirken eine Aktivierung. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) und volatile Anästhetika öffnen die TREK- Kanäle ebenfalls. Intrazelluläre Signalkaskaden über G- Proteine (G_s /cAMP/PKA und G_q /PLC/DAG/PKC) bewirken eine Kanalinhhibition über Phosphorylierung definierter Serinreste im Carboxyterminus. Das G- Protein EPAC beeinflusst diesen Vorgang über Regulation der intrazellulären cAMP- Konzentration. Ankerproteine für Kinasen, wie AKAP150, regulieren ebenfalls die Offenwahrscheinlichkeit dieser Kanäle. Endogen produziertes Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert TREK- 1 über die NO/cGMP/PKG- Signalkaskade. (Enyedi and Czirjak, 2010)

Für den TREK- 1- Kanal existieren zudem chemisch synthetisierte bzw. modifizierte Aktivatoren; als Beispiel sind das chemisch hergestellte Molekül ML67-33 oder biochemisch modifizierte Koffeinester zu nennen (Bagriantsev et al., 2013, Danthi et al., 2004).

TREK- 1 und -2 werden außerdem durch Stickstoffmonoxid (NO), sauren intrazellulären pH und volatile Anästhetika, wie Halothan, Isofluran, Xenon und Chloroform aktiviert, während die Klasse der Lokalanästhetika um Bupivacain oder Lidocain diese Kanäle inhibieren (Patel et al., 1999, Kindler et al., 1999).

Die Proteinkinasen A (PKA) und C (PKC), das Antidepressivum der Klasse der selektiven Serotonin- Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin und dessen Metabolit Norfluoxetin (NFX) (Kennard et al., 2005, Kim et al., 2012) und saurer extrazellulärer pH wirken inhibierend. Überdies interagieren TREK- 1 und TREK- 2 mit intrazellulären Proteinen wie AKAP150 oder Mtap2 (Lotshaw, 2007, Feliciangeli et al., 2015).

TRAAK wird durch alkalischen intrazellulären pH aktiviert und durch sauren pH inhibiert.

Diese K_{2P} - Subfamilie wird neben den beispielhaft genannten Regulationswegen durch eine Vielzahl weiterer physiologischer und pharmakologischer Substanzen komplex beeinflusst (Vgl. Abb. 5).

Alle drei Mitglieder dieser Subfamilie sind vorwiegend im embryonalen, aber auch im adulten zentralen und peripheren Nervensystem zu finden. Im ZNS weisen besonders Amygdala, Hippocampus, Kortex sowie Basal- und Hinterhorn ganglien ein hohes Expressionslevel dieser Kanal- Subfamilie auf. Das Expressionsmuster von TRAAK scheint fast ausschließlich auf das ZNS beschränkt, allerdings wurde eine geringe Expression in Muskelzellen des Myometriums in Kolokalisation mit TREK- 1 detektiert.

TREK- 1 findet sich zudem hoch exprimiert in Muskelzellen der viszerale Hohlorgane und von Blutgefäßen, Kardiomyozyten, Lunge, Nieren, Nebennieren sowie in Prostatatumoren.

TREK- 2 wurde bisher in Milz, Hoden, Pankreas und Niere und mit geringerem Expressionsniveau in Plazenta, Lunge, Leber, Kolon, Dünndarm und Herz nachgewiesen (Noel et al., 2011, Enyedi and Czirjak, 2010).

TASK („TWIK related Acid- Sensitive K^+ - channel“):

Diese Subfamilie, welche aus TASK- 1 (KCNK3), TASK- 3 (KCNK9) und TASK- 5 (KCNK15) besteht, bildet als einzige physiologisch Heteromere. Diese bestehen aus TASK- 1- und -3- Untereinheiten. TASK- 5 konnte noch nicht in der Zellmembran exprimiert werden. Die TASK- 1 und -3- Kanäle werden unter anderem durch sauren extrazellulären pH, Hypoxie, das Endocannabinoid Anandamid und G_q - Proteine inhibiert (Berg et al., 2004, Kang et al., 2004).

Aktiviert werden TASK- 1 und -3 durch Halothan und Isofluran und TASK- 1 zusätzlich durch alkalischen pH und die Proteinkinase A (Patel et al., 1999, Olschewski et al., 2006).

Die TASK- Familie weist ein heterogenes Expressionsmuster auf. Für TASK- 1 und -3 ist eine Expression im zentralen Nervensystem beschrieben. TASK- 1 wird zusätzlich in Pankreas, Plazenta, Gehirn, Lunge und Herz exprimiert (Davis, 2010). Im Herzen nimmt der TASK- 1-Kanal bei einer besonders starken Expression in den Vorhöfen, den Ventrikeln, sowie dem Atrioventrikularknoten und den Purkinjefasern eine wichtige Rolle im elektrischen Kreislauf der Herzerregung ein (Decher et al., 2015).

TALK („TWIK related Alkaline pH- activated K^+ - channel“):

In eine Familie mit TALK- 1 (KCNK16) und TALK- 2 (KCNK17) wird auch TASK- 2 (KCNK5) aufgrund der charakterisierenden Aktivierung durch alkalischen pH einsortiert (Cid et al., 2013, Kang and Kim, 2004).

TALK- 1 und -2 sind zudem durch NO und andere reaktive Sauerstoffspezies aktivierbar (Duprat et al., 2005). TASK- 2 wird durch Halothan und Isofluran aktiviert und durch Lokalanästhetika inhibiert (Gray et al., 2000, Kindler et al., 2003). Dagegen werden TALK- 1 und -2 durch Halothan, Chloroform und das Antiarrhythmikum Quinidin gehemmt. TALK- 2 ist durch Isofluran stimulierbar (Girard et al., 2001).

TASK- 2 wird im ZNS nur gering, dafür vermehrt in Pankreas, Niere, Plazenta und Leber exprimiert. TALK- 2 wurde ebenso wie TASK- 2 im Verdauungstrakt sowie zusätzlich in Herz, Lunge und ZNS detektiert. Das Pankreas ist das einzige Organ, in dem TALK- 1- Kanäle detektiert wurden. Hier ist die Expression TALK- 1 auf die exokrinen Zellen beschränkt, während TASK- 2 und TALK- 2 auch in den Langerhans- Inseln nachgewiesen wurden (Davis, 2010).

THIK („Tandem pore domain Halothane- Inhibited K^+ - channel“):

THIK- 1 (KCNK13) und THIK- 2 (KCNK12) werden aufgrund ihrer Inhibition durch Halothan als Subfamilie klassifiziert. Durch Hypoxie wird THIK- 1 inhibiert und durch Arachidonsäure aktiviert (Girard et al., 2001, Davis, 2010). THIK- 2 lässt sich erst durch Deletion eines Retentionssignals für das endoplasmatische Retikulum in der Zellmembran exprimieren (Bichet et al., 2015) .

THIK- 1 ist ubiquitär nachweisbar, wohingegen THIK- 2 in Lunge, Milz, Hirn, Herz, Skelettmuskulatur, Pankreas und Abschnitten der Niere vorkommt (Rajan et al., 2001).

TRESK („TWIK- Related Spinal cord K⁺- channel“):

Diese Subfamilie beinhaltet nur einen einzigen Kanal (TRESK (KCNK18)), der im Rückenmark und Hoden nachgewiesen werden konnte. Im Rückenmark ist die Expression besonders auf die Hinterwurzelganglien konzentriert, konnte aber in geringen Expressionsleveln auch im weiteren zentralen und peripheren Nervensystem detektiert werden. TRESK weist als einziger Kanal einen sehr kurzen Carboxyl- Terminus und eine besonders lange zytoplasmatische Domäne zwischen dem zweiten und dritten Transmembransegment auf, welche unter anderem mit Calcineurin oder Cyclosporin A interagieren kann (Czirjak and Enyedi, 2006a).

TRESK wird durch G_q- Proteine, die Proteinkinase C, Kalzium, Halothan und Isofluran aktiviert und durch Mibefradil, einen Ca²⁺- Kanalantagonisten, mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Lokalanästhetika inhibiert (Czirjak and Enyedi, 2006b, Keshavaprasad et al., 2005).

1.6 Pathophysiologische Beteiligung der K_{2P}- Kanäle

Die K_{2P}- Kanäle sind zwar ubiquitär im menschlichen Organismus vertreten, weisen allerdings ein sehr diverses Expressionsmuster auf, wodurch sich die Beteiligung an unterschiedlichsten physiologischen Prozessen erklärt. In erster Linie kontrollieren Kaliumkanäle durch ihre hyperpolarisierende Wirkung das Membranruhepotenzial und üben großen Einfluss auf die zelluläre Erregbarkeit aus. Sie sind komplex und vielfältig reguliert. Bei vielen verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen wurde bereits eine Beteiligung der K_{2P}- Kanäle gezeigt und die klinische Relevanz diskutiert.

Von besonderer klinisch- therapeutischer Bedeutung ist die Funktion der K_{2P}- Kanäle beispielweise bei Herzrhythmusstörungen, der Nozizeption, in der Anästhesie, bei Depressionen, der Regulation des Wasser- Salz- Haushalts und in der Regulation der Atmung über Chemosensoren.

Im Herzen sind vor allem TASK-, TALK- und TWIK- Kanäle exprimiert. Durch ihre pH- Sensitivität werden diese Kaliumkanäle bei extrazellulärer Protonenanreicherung unter ischämischen Bedingungen inhibiert, die Zellmembran depolarisiert und das Aktionspotenzial verlängert sich (Decher et al., 2015). Für durch Hypokaliämie bedingte Herzrhythmusstörungen werden sogenannte paradoxe Depolarisationen als Ursache diskutiert. Diese beruhen auf dem Phänomen der „Dynamischen Ionenselektivität“ des TWIK- 1- Kanals, welcher unter hypokaliämischen Bedingungen in einen für Natriumionen permeablen Zustand wechselt und

nun eine exzitatorische Rolle einnimmt (Ma et al., 2011). Mutationen im TASK- 1- Kanal wurden als prädisponierender Faktor für Vorhofflimmern im Tiermodell nachgewiesen (Liang et al., 2014). TALK- 2- gain of function- Mutationen scheinen das Risiko für Reentry-Tachykardien über eine schnellere Repolarisation zu erhöhen (Friedrich et al., 2014).

Bei der Wahrnehmung von nozizeptiven Reizen nehmen K_{2P} - neben weiteren Ionenkanälen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von peripheren Schmerzimpulsen ein. Als besonders wichtig erscheinen hier der TREK- und der TRESK- Kanal mit hohen Expressionsleveln in Hinterhorn- und sensorischen Ganglien. Eine Stimulation der Kanäle führt zu einer Hyperpolarisation und einer daraus folgenden Schwellenwertanhebung für Schmerzreize. In diesem Kontext zeigten Knockout- Mäuse eine Häufung von Hyperalgesien (Alloui et al., 2006, Noel et al., 2009, Pereira et al., 2014). Pharmakologisch gesehen sind diese Kanäle interessante Angriffspunkte für neue Analgetika.

Fast alle K_{2P} - Kanäle werden durch lokale und volatile Anästhetika auf verschiedene Weise reguliert. Mäuse, bei welchen ein Knockout der durch Anästhetika aktivierten K_{2P} - Kanäle TREK- 1, TASK- 1 und TASK- 3 vorgenommen wurde, zeigten einen gegenüber volatilen Anästhetika resistenten Phänotyp (Linden et al., 2006, Linden et al., 2007). Durch die Aktivierung von K_{2P} - Kanälen in zerebralen Neuronen bei ischämischen Ereignissen kommt es durch die Hyperpolarisation zur Vermeidung einer Hyperexzitabilität, womit eine Neuroprotektion bewirkt wird (Heurteaux et al., 2004).

Der TREK- 1- Kanal ist an der Freisetzung des Transmitters Serotonin und somit an der Entstehung von Depressionen beteiligt. Er weist eine hohe Sensitivität gegenüber antidepressiv und antipsychotisch wirkenden Medikamenten wie Fluoxetin, Paroxetin, Fluphenazin und Chlorpromazin auf. Bei TREK- 1- Knockout- Mäusen wurde ein depressions-resistenter Phänotyp festgestellt (Kennard et al., 2005, Moha Ou Maati et al., 2012, Borsotto et al., 2015).

Im Rahmen einer autoimmunen Enzephalomyelitis bewirkte eine Inaktivierung von TREK- 1- Kanälen eine erhöhte Leukozytenpermeabilität der Blut- Hirn- Schranke. Behandlungserfolge wurden mit dem TREK- 1- Aktivator Riluzol erzielt (Bittner et al., 2014, Bittner et al., 2013).

TASK- 1 und TASK- 3 sind wichtig für die Ausschüttung des Hormons Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Ein Knockout bewirkt einen primären

Hyperaldosteronismus. Dieser Effekt macht die Kanäle zu möglichen Angriffspunkten für Bluthochdruckmedikamente (Czirjak et al., 2000, Davies et al., 2008, Heitzmann et al., 2008). Es wird die Möglichkeit diskutiert, K_{2P} - Kanäle als Tumormarker einzusetzen sowie als pharmakologische Angriffspunkte zu nutzen. In Prostata-, Lungen-, Ovarial- oder Brustkrebszellen wurde eine Überexpression von K_{2P} - Kanälen nachgewiesen. Beispielsweise ist TASK- 3 gesteigert in Lungen-, Brust- und Ovarial- Krebszellen exprimiert. Eine Inhibition führte zu einer verringerten Zellproliferation und gesteigerter Apoptose (Innamaa et al., 2013). Gegen die extrazelluläre Domäne von TASK- 3 entwickelte Antikörper führten ebenfalls zu einer gesteigerten Apoptose der Tumorzellen und verringerter Metastasierung (Sun et al., 2016). In Prostatakarzinomen korreliert die Überexpression von TREK- 1 mit dem Stadium der Erkrankung (Voloshyna et al., 2008). Niedrige TASK- 2- Expressionslevel wurden in Aldosteron produzierenden Adenomen der Nebennierenrinde gefunden, was zu einem primären Hyperaldosteronismus führte (Lenzini et al., 2014).

Die Beteiligung der K_{2P} - Kanäle an den exemplarisch angeführten (patho-) physiologischen Prozessen verdeutlicht die entscheidende Funktion der K_{2P} - Kanäle im Zusammenspiel des humanen Organismus, woraus die Hoffnung resultiert, neue pharmakologische Angriffspunkte und modulierende Substanzen zur Behandlung diverser Krankheiten zu entdecken.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Pharmaka in ihrer Wirkung auf K_{2P} - Kanäle untersucht und die Aufklärung der Bindungsstelle und des Wirkmechanismus des potentesten der getesteten K_{2P} - Agonisten begonnen.

2. Material und Methoden

Zur Messung der Ionenströme der K_{2P} - Kanäle mittels der Patch- Clamp- Technik wurden *Xenopus laevis*- Oozyten als Expressionssystem gewählt, in welche in vitro synthetisierte mRNA des zu untersuchenden Ionenkanals injiziert wurde. Zur biophysikalischen Charakterisierung von Ionenkanälen und zur Aufklärung der Struktur- Funktions- Beziehung ist die Nutzung der Froschoozyten als eine zuverlässige Methode etabliert. Sie weist mit einer gleichmäßigen und gut reproduzierbaren Expression gute experimentelle Grundvoraussetzungen auf (Gundersen et al., 1984). Alternativ nutzbare Expressionssysteme stellen beispielsweise HEK293-, COS- 7- oder CHO- Zelllinien dar.

Die Oozyten des afrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* eignen sich besonders für elektrophysiologische Experimente, da sie die Untersuchung von Ionenkanälen in einem standardisiertem Rahmen ermöglichen (Methfessel et al., 1986). Die Haltung der Frösche ist in einem Süßwasser- Aquarium unproblematisch möglich, genauso wie die Gewinnung der relativ großen Oozyten (circa 1 mm im Durchmesser). Pro Frosch kann eine große Anzahl an Oozyten gewonnen werden. Die operative Gewinnung und Präparation der Oozyten geht der Injektion der RNA des ausgewählten Ionenkanals in die Proteinbiosynthese- Maschinerie der Oozyte voraus. Der Injektion schließt sich die mehrtägige Inkubation der Oozyten an; in dieser Zeitspanne findet die Synthese und Transport der Ionenkanäle in die Plasmamembran statt. Die *Xenopus laevis*- Oozyten sind nur mit wenigen endogenen Ionenkanälen ausgestattet, die die Messung der durch exogene RNA- Injektion von der Oozyte stark überexprimierten zu untersuchenden K_{2P} - Kanäle beeinflussen könnten. Ein durch Kalzium aktivierter Chloridkanal erzeugt in *Xenopus laevis*- Oozyten den größten endogenen Strom, welcher jedoch durch Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)- Zusatz in den verwendeten Lösungen unterdrückt werden kann. EGTA komplexiert das zweiwertige Kalzium, den physiologischen Aktivator der Kanäle und entfernt diesen dadurch aus der Lösung (Miledi and Parker, 1984). Die Oozyten weisen eine hohe Translationskapazität auf und führen nach posttranslationaler Modifikation einen Einbau der Kanäle in die Membran durch (Moar et al., 1971). Abschließend muss darauf hingewiesen werden, dass die hier untersuchten Kaliumkanäle überwiegend aus Klonen aus dem humanen Organismus stammen und somit nicht in ihrer ursprünglichen Zellumgebung ausgebildet werden, sodass für die Erforschung des Kanalverhalten und dessen Interaktion im Säugerorganismus weitere, jedoch aufwändigere Expressionssysteme, wie die erwähnten Zelllinien oder Tiermodelle herangezogen werden müssen. Zur Untersuchung der reinen biophysikalischen Eigenschaften der Kaliumkanäle sind die Oozyten des *Xenopus laevis* jedoch prädestiniert.

2.1 Oozyten- Präparation und RNA- Injektion

Die adulten Froschweibchen der Gattung *Xenopus laevis* wurden vor der operativen Gewinnung der Oozyten durch Zugabe des Lokalanästhetikums Tricain (Ethyl-3-aminobenzoat-methansulphonat) ins Wasser der Vorbereitungsbox narkotisiert. Während der Entnahme der Oozyten durch eine kleine abdominale Inzision, lagerten die Frösche auf Eis. Die Oozyten wurden folgend mehrmals in OR1- Lösung (siehe 2.5 Übersicht aller verwendeten

Lösungen und Chemikalien) gewaschen, grob manuell geteilt und vereinzelt, um eine erste Selektion der verschiedenen Entwicklungsstadien durchzuführen, da nur die Reifestadien V-VI nach Dumont (Dumont, 1972) für die Experimente genutzt wurden. Die Reifestadien werden in Abbildung 6 gezeigt. Die unreifen *Xenopus laevis*- Oozyten wurden durch diesen Vorgang entfernt.

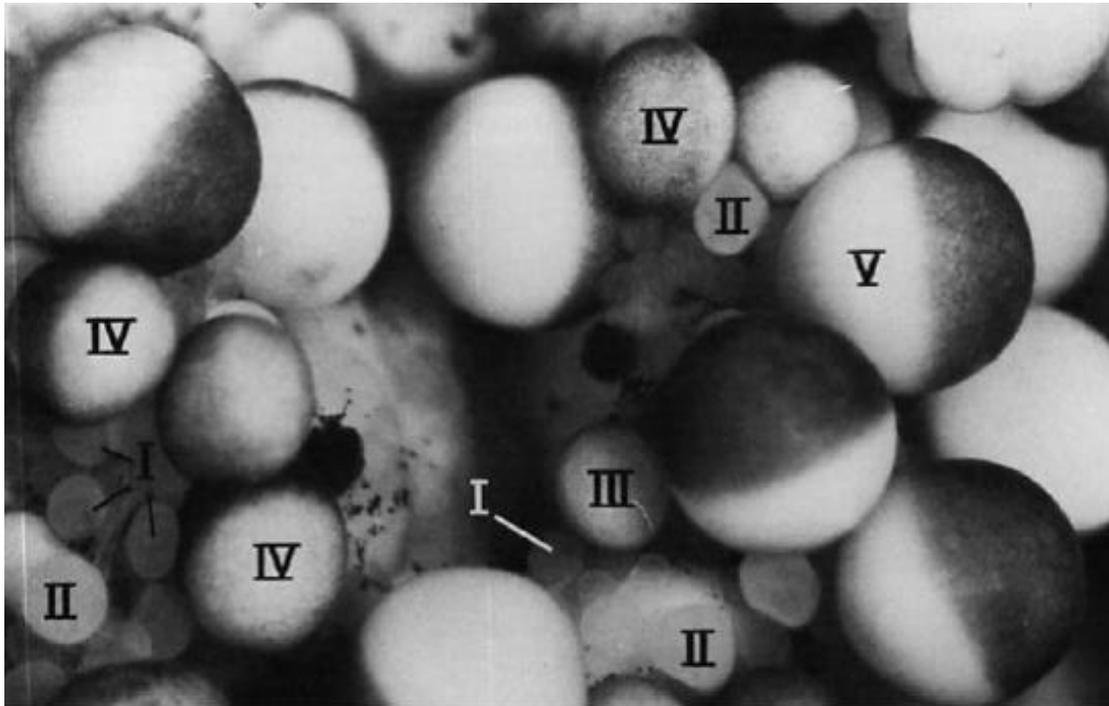


Abb. 6: Oozyten des *Xenopus laevis* verschiedener Reifestadien. Durch ihre Größe und Musterung in einen helleren, vegetativen und dunkleren, animalen Pol sind die reifen Oozyten gut selektierbar. Die römischen Ziffern markieren die Stadien I bis V (Abbildung übernommen aus Dumont, 1972).

Anschließend folgte eine einstündige Inkubation in OR1- Lösung bei 19°C unter Schütteln mit 0,2%iger Kollagenase- Typ 2 mit der Enzymaktivität von 360 U/mg, wodurch das im Follikelgewebe enthaltene Kollagen enzymatisch verdaut wurde. Durch eine darauffolgende Waschung der Oozyten mit OR2- Lösung wurde die Proteaseaktivität der Kollagenase durch das enthaltene Kalzium gestoppt und Follikelgewebsreste entfernt. Die Lagerung der Oozyten bis zur RNA- Injektion fand in OR2- Lösung bei 17°C im Brutschrank statt. Zwischen zwei Operationen lag für jeden Frosch ein Mindestzeitraum von 12 Wochen und jedes Tier wurde maximal viermal verwendet. Vor der RNA- Injektion wurden Oozyten der Reifestadien V- VI nach Dumont (Vgl. Abb. 6) (Dumont, 1972) manuell selektiert. Danach folgte unter mikroskopischer Sicht mithilfe zweier Pinzetten die mechanische Entfernung der äußeren Follikelschicht, welche über der der Oozytenmembran direkt anliegenden und formgebenden Vitellinschicht liegt. Über

zytoplasmatische Brücken, sogenannte gap junctions, beeinflusst die Follikelschicht die Reifung der Oozyte und ist für die Nährstoffversorgung mitverantwortlich (Dumont and Brummett, 1978).

Die RNA- Injektionspipetten wurden aus dünnwandigem Borosilikatglas (GB150T-10, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) hergestellt, welches von einem Mikropipetten- Puller (Model P- 97/ Model P- 000, Sutter Instruments Co., USA) ausgezogen wurde. Um die Zellmembran möglichst wenig zu schädigen, wurden die Pipetten unter mikroskopischer Sicht an einem Platindraht scharf auf einen Durchmesser von circa 15 µm gebrochen und die RNA von einem sterilen Paraffinfilm aufgezogen. In jede Oozyte wurde mittels einer manuell zu bedienenden Injektionsspritze circa 50 nl der jeweiligen mRNA injiziert. Es wurde zentral am braunen, animalen Pol injiziert, welcher hauptsächlich den Nukleus enthält, wo die Synthese der Membranproteine lokalisiert ist. Anschließend wurden die Oozyten in Well- Platten (24 Well, Standard F, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) mit steriler Testlösung für zwei bis sechs Tage im Brutschrank bei 17°C inkubiert; in dieser Zeitspanne erfolgte jeweils die Proteinexpression der Kanäle in die Oozytenmembran.

Alle verwendeten Lösungen werden in Kapitel 2.5 genau aufgeführt.

2.2 In- vitro- RNA- Synthese und Mutagenese

Die Injektions- RNA wurde ausgehend von einer in Plasmidform vorliegenden DNA durch in- vitro- Transkription hergestellt. Zur Vermehrung der Plasmid- DNA wurde diese in kompetente Escherichia coli K12 DH5α transformiert und über Nacht bei 37°C auf Ampicillin- LB- Agar kultiviert. Es folgte die Animpfung einer Flüssigkultur, die wieder über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert wurde. Zur Isolierung der Plasmid- DNA aus den Bakterien wurde das Maxiprep- Kit „GeneJET Plasmid Maxiprep Kit #K0491“ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur RNA- Synthese wurde das DNA- Plasmid anschließend durch ein Restriktionsenzym linearisiert und mithilfe einer Ionenaustauscher- Säule aufgereinigt (Nucleo Spin Gel and PCR- Clean- Up REF74060950, Macherey- Nagel, Düren, Deutschland). Zur in- vitro- Transkription der RNA wurde das „Ambion mMessage mMachin SP6 Transcription“- Kit (CAT#AM1340, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) angewendet. Vom linearisierten Plasmid- DNA- Template wurde durch die SP6- RNA- Polymerase die RNA synthetisiert. Zwecks Reinigung der RNA und Entfernung von Puffern etc. wurde mit Ammoniumchlorid eine Fällung der RNA durchgeführt und das Pellet in 20 µl

RNAse- freiem Wasser resuspendiert. Die RNA- Konzentration und -Reinheit wurden spektralphotometrisch bei den Wellenlängen 260 bzw. 280 nm bestimmt (NanoDrop Products, Wilmington, USA). Die Lagerung der RNA bis zur Injektion fand bei -20°C statt. Während des gesamten Prozesses wurde die RNA nach jedem Schritt per Gelelektrophorese kontrolliert.

Für die Expression in Oozyten müssen die Ionenkanal- Konstrukte in geeigneten Vektorsystemen vorliegen; hier sind die für *Xenopus laevis*- Oozyten konstruierten Vektoren pBF, pSGEM, pExo und der für Oozyten und Zellen geeignete Vektor pFAW zu nennen.

Allen verwendeten K_{2P}- Kanalklonen sind in der GenBank- Nummern zugeordnet, die die genaue genetische Sequenz- Identifikation ermöglichen. Die GenBank ist eine online Datenbank aller öffentlich verfügbaren genetischen Sequenzen verschiedener Proteine.

Folgende Tabelle führt die GenBank- Nummer und den jeweiligen Expressionsvektor aller verwendeten K_{2P}- Kanäle auf:

K _{2P} - Kanal	GenBank- Nummer	Expressionsvektor
rTREK- 1	NM_172042	pSGEM
hTREK- 1	XM_011509524	pFAW
hTREK- 2	NM_138318	pSGEM
hTRAAK	AF247042.1	pSGEM
hTASK- 1	AF065163	pSGEM
hTASK- 3	NM_016601	pSGEM
hTALK- 1	NM_032115.3	pExo
hTALK- 2	EU978944.1	pBF
hTHIK- 1	NM_022054	pFAW
hTRESK	NM_181840.1	pBF

Tab. 1: GenBank- Nummer, sowie Expressionsvektor aller verwendeten K_{2P}- Kanäle. Die Kürzel „r“ (rat) bzw. „h“ (human) beschreiben, ob es sich um einen Ratten- oder Homo sapiens- K_{2P}- Kanal handelt.

Um einen gezielten Austausch einer Aminosäure in der Wildtyp- Sequenz durchzuführen, wurde das „Site- Directed Mutagenesis Kit E05525“ (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Die Einführung der Punktmutation gelang mithilfe einer Polymerase- Kettenreaktion, deren Primerpaare die auszutauschende Aminosäure aufwiesen. Die Matrizen- DNA ist im Vergleich zur gewonnenen, die Mutation enthaltenden DNA methyliert und wurde durch eine spezifische Restriktionsendonuklease geschnitten, so dass nur die mutierten Plasmide in *E. coli* transformiert wurden. Aus einzelnen Kolonien wurden Plasmide isoliert und durch Sequenzierung (Microsynth AG, Lindau, Baden-Württemberg, Deutschland) auf den korrekten Basenaustausch überprüft. Es schloss sich die RNA- Synthese aus der DNA der Klone, welche korrekt mutiert worden waren, an.

2.3 Elektrophysiologische Messungen mit der Patch- Clamp- Technik

Die Patch- Clamp- Technik hat sich seit ihrer Entwicklung durch Erwin Neher und Bert Sakmann 1976 zum aktuellen Goldstandard der elektrophysiologischen Untersuchung von Ionenkanälen in der Plasmamembran einer Zelle weiterentwickelt (Neher and Sakmann, 1976, Hamill et al., 1981).

Der Name leitet sich aus der Methode selbst ab, bei welcher ein kleiner Membranflicken (eng. patch- Flicken), abgedichtet durch eine gläserne Patchpipette, die die Messelektrode enthält, von der restlichen Membran abgeschirmt und während der Messung auf einem vorgegeben Membranpotenzial festgeklemmt wird (eng.: (to) clamp- festklemmen, befestigen).

Alle Messungen wurden in dieser sogenannten „voltage- clamp“- Konfiguration mit definiertem konstanten Haltepotenzial durchgeführt. Als Ausgangsbedingung liegt keine Spannungsdifferenz zwischen Mess- und Referenzelektrode vor. Ein Regelkreis garantiert durch einen angepasst applizierten Klemmstrom eine konstante Aufrechterhaltung der gewählten Klemmspannung. Bei einer Aktivierung der Kanäle wird aufgrund des Ionenstroms über die Membran eine Abweichung der tatsächlichen Membran- von der vorgegeben Klemmspannung detektiert. Diese Spannungsdifferenz wird von zwei Verstärkern an eine Schnittstelle weitergeleitet, die das analoge in ein digitales Signal umwandelt, welches wiederum am Messrechner als proportionale Stromantwort dargestellt wird (Abb. 7).

Ionenverschiebungen im Pikoampère- Bereich lassen sich mit dieser Technik aufgrund sehr großer Widerstände in den Verstärkern, die den Signalverlust minimieren, detektieren und analysieren.

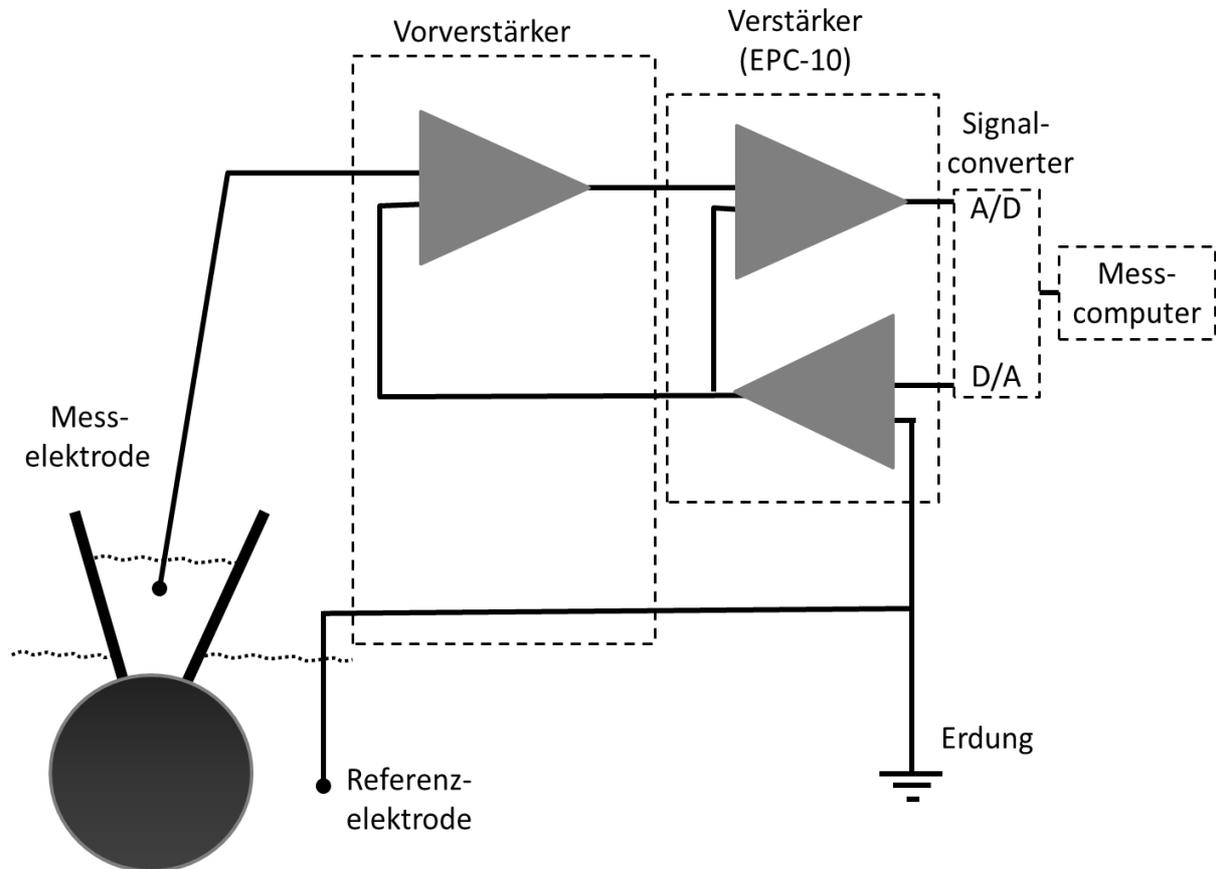


Abb. 7: Schematischer elektrischer Schaltplan des Patch- Clamp- Messtands. Darstellung des geschlossenen Regelkreises zwischen Mess- und Referenzelektrode. Über die hohen elektrischen Verstärker- Widerstände wird das Signal vervielfältigt, folgend vom Converter vom analogen ins digitale Signal umgewandelt und durch die „PatchMaster“- Software als Stromantwort dargestellt.

Die Methode der Patch- Clamp- Technik kann in vier verschiedenen Konfigurationen der Patchpipette im Verhältnis zur Membran durchgeführt werden (Vgl. Abb. 8):

Begonnen wird prinzipiell mit dem Anpressen der Patchpipette an die Zellmembran, es folgt die Applikation eines leichten Unterdrucks, welche die Formation eines elektrischen Abdichtwiderstands zwischen Pipette und Membranpatch im Giga- Ohm- Bereich bewirkt, was als „Gigaseal“ (eng.: seal- Dichtung, Versiegelung) bezeichnet wird. Dies ist die Grundvoraussetzung für einen stabilen und störungsarmen Patch. Nun liegt die sogenannte „on- cell“- oder „cell- attached“- Konfiguration vor, aus welcher durch graduell abgestimmte Über- oder Unterdruck- Applikation in die „whole- cell“- Konfiguration gewechselt werden kann.

Die Zellmembran unter der Pipette wird hierbei durchbrochen, die Abdichtung zwischen Pipette und Membran bleibt jedoch gewahrt, sodass Ströme über die gesamte Plasmamembran aufgezeichnet werden können.

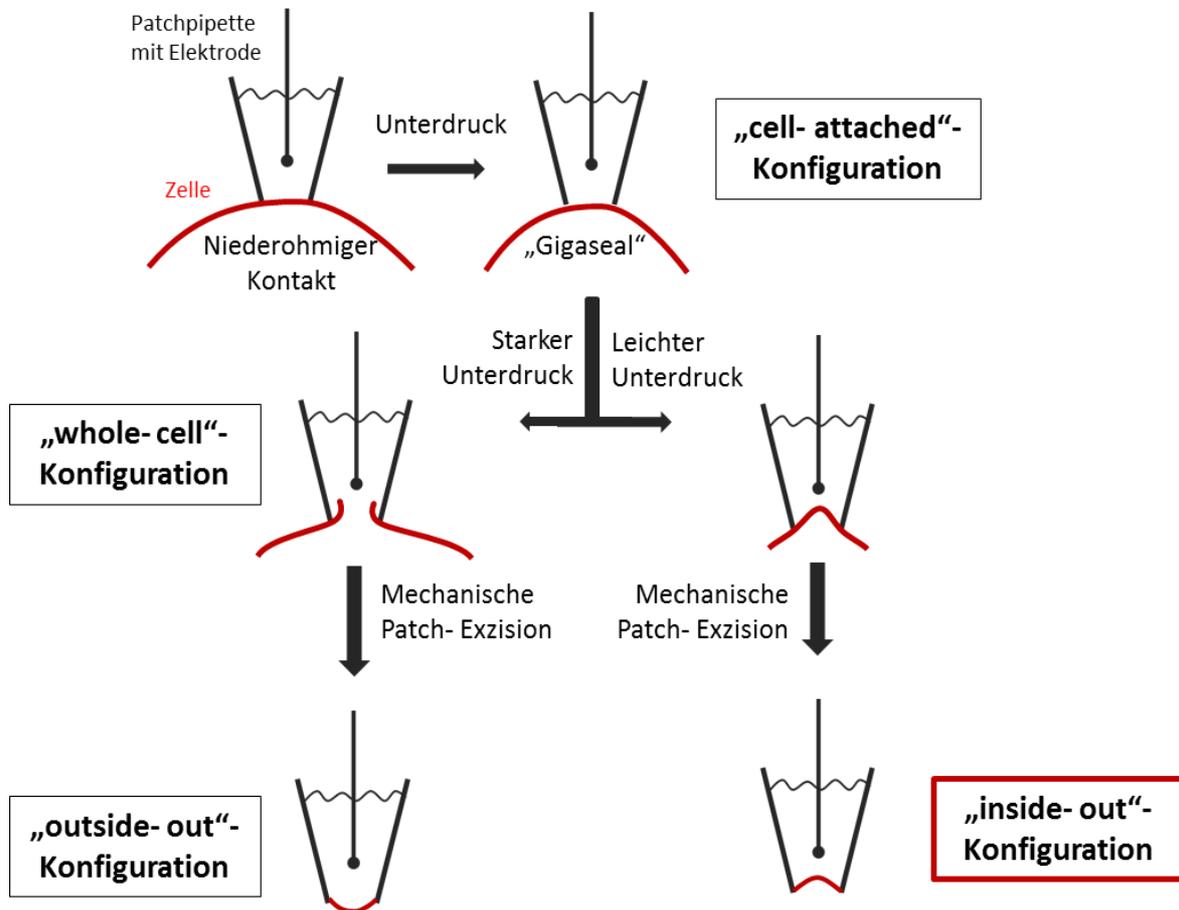


Abb. 8: Vorgehen zum Erreichen der unterschiedlichen Patch- Clamp- Konfigurationen. Ausgangszustand ist die sogenannte „cell- attached“- oder „on- cell“- Konfiguration. Nach der Formation eines „Gigaseals“ mit Kontaktwiderständen im Gigaohm Bereich können „inside- out“- Patches, wie sie in dieser Arbeit ausschließlich gemessen wurden, durch mechanischen Zug exzidiert werden. Zur Bildung von „outside- out“- Patches ist ein Durchbruch der Zellmembran in die „whole- cell“- Konfiguration vor Exzision notwendig.

Durch Zug an der Pipette mit einem gleichzeitig erzeugten Unterdruck werden sogenannte „outside- out“- Patches erzeugt, was auf der Tatsache beruht, dass die Ränder des Patches durch Unterdruck und Zug zum Zentrum umschlagen und wieder fusionieren, sodass eine Umkehrung von intra- und extrazellulärer Membranseite stattfindet. Die extrazelluläre Seite der Plasmamembran weist nun zur Badlösung, während die intrazelluläre Seite der Pipettenlösung ausgesetzt ist. Durch einfachen Zug an der Pipette aus der „cell- attached“- Konfiguration erhält man die sogenannte „inside- out“- Konfiguration, bei welcher die Extrazellulärseite der Lösung in der Patchpipette und die Zytosolseite der jeweiligen applizierten Badlösung ausgesetzt wird.

Folgende Standardbedingungen wurden für die elektrophysiologischen Experimente gewählt: Jeder Messung vorangestellt war die mechanische Devittellinisierung einer zuvor mit RNA-injizierten und einige Tage inkubierten *Xenopus laevis*-Oozyte. Während der Messung lagerte diese in einer mit Badlösung gefüllten Messkammer mit Glasboden oberhalb eines inversen Lichtmikroskops (Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Die Standard-Badlösung setzte sich wie folgt zusammen: 120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA und 1 mM Pyrophosphat. Das Kaliumchlorid (KCl) sorgte nach Dissoziation in K^+ und Cl^- für die gewünschte Konzentration an Kaliumionen in der Lösung, HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) wurde als pH-Puffersubstanz eingesetzt, EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) zur Unterdrückung der endogenen Chloridkanalströme. Das Pyrophosphat beugte einer Beeinflussung des Stroms im exzidierten Patch durch Dephosphorylierung vor. Als pH-Wert der Badlösung, welche das intrazelluläre Milieu simuliert, wurde 7,2 gewählt und damit eine Annäherung an den physiologischen pH-Wert von 7,35 bis 7,45 angestrebt. Die Titration des pH-Werts von 7,2 erfolgte durch HCl bzw. KOH. Alle verwendeten Chemikalien sind als möglichst hochkonzentrierte Stammlösungen angesetzt und bei $-20^{\circ}C$ gelagert worden. Unmittelbar vor der Verwendung folgte die Verdünnung auf die gewünschte Konzentration mittels der Standard-Badlösung. Ein mit Reservoirs verbundenes Multibarrelsystem ragte in die Messkammer. Es bestand aus mehreren nebeneinander liegenden Thetaglas-Röhrchen, was die Applikation von bis zu zehn verschiedenen Substanzen oder Lösungskonzentrationen pro Patch ermöglichte. Der kontinuierliche Ablauf der Lösungen wurde über ein Absaugsystem gewährleistet. Das Multibarrelsystem, sowie auch die die Patchpipette waren über Mikromanipulatoren (SM1, Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) unabhängig voneinander beweglich.

Die Standardlösung in der Pipette, welcher die Extrazellulärseite des Patches ausgesetzt wurde, enthielt folgende Substanzen: 4 mM KCl, 116 mM NMDG⁺, 10 mM HEPES, 3,6 mM CaCl₂ und wurde ebenfalls auf einen pH von 7,2 titriert. Die organische Verbindung N-Methyl-D-glucamin (NMDG⁺) wurde als nicht durch die Kanäle permeierendes Kation zur Kompensation der asymmetrischen Kaliumkonzentrationen für extra- und intrazellulär ausgeglichene Ionenkonzentrationen eingesetzt, um einer osmotisch bedingten Flüssigkeitsverschiebung über die Plasmamembran entgegenzuwirken. Die Kaliumkonzentrationen wurden ebenfalls an physiologischen Bedingungen angenähert (4 bzw. 120 mM).

Die Patchpipetten wurden mithilfe eines Mikropipettenpullers (Model P-97 und Model P-1000, Sutter Instruments, USA) ausgezogen und anschließend unter mikroskopischer Sicht hitzepoliert um eine möglichst ebene Pipettenspitze zu erhalten. So wurden Öffnungswiderstände zwischen 300 und 600 k Ω erreicht, was einem korrelierenden Durchmesser von 30 bis 60 μ m entspricht. Vor Verwendung wurde die Pipettenspitze in Paraffinöl getaucht, um die Ausbildung eines elektrisch isolierenden Kontakts der Pipettenöffnung zur Oozytenmembran zu optimieren. Anschließend wurde die Pipette mit der Pipettenlösung unter Zuhilfenahme eines dünnen Quarzglas-Filaments (MicroFil, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, USA) blasenfrei gefüllt und in den Pipettenhalter eingespannt.

Vor dem Eintauchen der Patchpipette in die Badlösung wurde ein Überdruck erzeugt, der eine Vermischung von Pipetten- und Badmedium verhinderte, sowie Pipettenspitze und Zellmembran von störenden Partikeln bereinigte. Durch plötzlichen Wechsel von Über- zu Unterdruck wurde die Oozytenmembran an die Patchpipette gezogen, was die Entstehung eines stabilen Gigaseals bewirkte. Durch ruckartiges Zurückfahren des Pipetten-Mikromanipulators wurde der Membranpatch exzidiert. Anschließend konnte mit der Perfusion der Zytosolseite des „inside-out“-Patches und der intrazellulären Strukturen der jeweils exprimierten K₂P-Kanäle mit verschiedenen Lösungen begonnen werden.

Die Stromprotokolle, welche auch als Traces bezeichnet werden (eng.: trace- Spur), wurden bei einer vorgegebenen Membranspannung von +40 mV in kontinuierlichen Pulsen als Messprotokoll aufgenommen. Zur Abschirmung gegen elektrische Signalstörungen wurde das Patch-Clamp-Setup innerhalb eines Faraday'schen Käfigs und zwecks Vermeidung mechanischer Störungen auf einer hydraulischen Federung installiert.

2.4 Datenaufnahme, statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung

Der Patch-Clamp-Messstand, mit welchem alle elektrophysiologischen Messungen dieser Arbeit generiert wurden, enthielt zur Datendarstellung und -aufnahme einen Computerrechner mit dem Betriebssystem Windows 8. Zur Aufnahme der Messdaten wurde der Computer an einen digital gesteuerten „EPC 10 USB Patch Clamp“-Verstärker angeschlossen und das dazugehörige Softwareprogramm „PatchMaster v2x72“ (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Rheinland-Pfalz, Deutschland) installiert.

Zur statistischen Auswertung wurden die am Messstand ermittelten Ergebnisse in das Programm „Microsoft- Office Excel“ (Microsoft Corporation, Redmond, USA) übertragen und analysiert.

Die Berechnung des arithmetischen Mittelwerts (M), der dazugehörigen Standardabweichung (SD) und des Standardfehlers (SE) wurde folgendermaßen durchgeführt:

Mittelwert (M):

$$M = \frac{\sum x_i}{n}$$

M= Mittelwert

x_i = Messwert

n= Anzahl der Messwerte

Standardabweichung (SD):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - M)^2}{n - 1}}$$

M= Mittelwert

x_i = Messwert

n= Anzahl der Experimente

Standardfehler (SE):

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

SD= Standardabweichung

n= Anzahl der Experimente

Zur Darstellung von Primärdaten, zur Analyse und zur statistischen Auswertung wurde die Datenverarbeitungssoftware „IGOR Pro v6.36A“ (WaveMetrics, Inc., Lake Oswego, USA) verwendet. Für die Auswertung von Dosis- Wirkungsbeziehungen wurden die Datenpunkte für jedes Experiment auf die maximale Stromantwort normiert und der arithmetische Mittelwert jeder Messreihe erstellt.

Die Berechnung und graphische Auswertung der mittleren effektiven Konzentration (EC₅₀) bzw. der Inhibitionskonstanten (IC₅₀) erfolgte unter Verwendung der Hill- Funktion:

$$I/I_{\max} = \frac{1}{1 + \left\{ \frac{X}{X_{1/2}} \right\}^H}$$

I= Strom bei Applikation von Konzentration (X)

I_{max}= Strommaximum

X= Konzentration der applizierten Substanz

X_{1/2}= Konz. der applizierten Substanz für einen halbmaximalen Effekt → EC₅₀ bzw. IC₅₀

H= Hill-Koeffizient

Die Berechnung der durchschnittlichen Potenzierung des Stroms („fold change“) durch einen Kaliumkanal- Aktivator wurde folgendermaßen bestimmt:

$$\text{fold change} = \frac{I_{\max}}{I_K}$$

I_K= Kontrollstrom: Stromantwort unter standardisierten Ausgangsbedingungen

I_{max}= Strommaximum

2.5 Übersicht aller verwendeten Lösungen und Chemikalien

A. Oozyten- Inkubationslösungen

OR1- Lösung für *Xenopus laevis*- Oozyten zur Lagerung nach operativer Entnahme bis Ende des Kollagenase- Verdaus (pH 7,5; titriert mit NaOH):

NaCl	82,5 mM
KCl	2 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM
HEPES	5 mM

OR2- Lösung zur Beendigung des Kollagenase- Verdaus der Oozyten (pH 7,5; titriert mit NaOH):

NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,8 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM
HEPES	5 mM

Testlösung zur Lagerung der injizierten Oozyten während der Inkubation im Brutschrank bis zum Beginn der Patch- Clamp- Experimente (pH 7,4; titriert mit NaOH):

NaCl	54 mM
KCl	30 mM
NaHCO ₃	2,4 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,82 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,41 mM
Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	0,33 mM
TRIS	7,5 mM

B. Messlösungen für „inside- out“- Patch- Clamp- Experimente mit physiologischen Kaliumkonzentrationen

Badlösung: standardisiertes Intrazellulärmedium; alle applizierten Chemikalien wurden mittels der Badlösung auf die Zielkonzentrationen verdünnt bzw. darin gelöst (pH 7,2; titriert mit KOH bzw. HCl):

KCl	120 mM
HEPES	10 mM
EGTA	2 mM
Pyrophosphat	1 mM

Für die verwendete Rubidiumlösung wurde KCl äquivalent zu RbCl ausgetauscht.

Pipettenlösung: standardisiertes Extrazellulärmedium; (pH 7,2; titriert mit KOH bzw. HCl):

NMDG	116 mM
KCl	4 mM
HEPES	10 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	3,6 mM

C. Chemische Substanzen mit Bezugsquellen, CAS- Nummern und Lösungsmittel der angelegten Stammlösungen

SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, Eschenstraße 5, 82024 Taufkirchen, Deutschland:

2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB); CAS: 524-95-8; gelöst in DMSO

2-Amino-6-(trifluoromethoxy)benzothiazol (Riluzol); CAS:1744-22-5; gelöst in DMSO

3-(3,6-Dichloro-Carbazol-9-yl)-propan-1,2-diol; CAS: 76193-93-6; gelöst in DMSO

Diphenylborinic- anhydrid (DBPA); CAS: 4426-21-5; gelöst in DMSO

Ethyl 3-aminobenzoat- methanesulfonat (Tricaine); CAS: 886-86-2

Hexahydroadiphenin (Drofenin hydrochloride); CAS:548-66-3; gelöst in DMSO

(5,6,7,8-Tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl]-amin (BL- 1249); CAS: 18200-13-0; gelöst in DMSO

Tetrapentylammoniumchlorid (TPA-Cl); CAS: 4965-17-7; gelöst in Wasser

Biochrom AG, Leonorenstraße 2-6, 12247 Berlin, Deutschland:

Benzylpenicillin-Natrium; CAS: 69-57-8/Streptomycinsulfat; CAS: 3810-74-0

Collagenase Typ II CLS II; CAS: 9001-12-1

3. Ergebnisse: Charakterisierung der Wirkung und des Wirkmechanismus von pharmakologischen K_{2P} -Kanalagonisten

Die K_{2P} -Familie weist vielfältige und diverse Expressionsmuster und Modulationsmechanismen im humanen Organismus auf. Darauf basiert das aktuelle Interesse, die pathophysiologisch relevanten K_{2P} -Kanäle als Zielstrukturen bei der Entwicklung neuer Pharmaka zu nutzen. In der letzten Dekade wurde eine Reihe von pharmakologischen Kaliumkanalinhibitoren und -aktivatoren identifiziert. In diesem Kontext sind die in dieser Arbeit untersuchten Pharmaka BL-1249 ((5,6,7,8-Tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl]-amin) (Vgl. Abb. 9, (A)), 2-APB (2-Aminoethoxydiphenyl-borat) (Vgl. Abb. 9, (D)), Drofenin (Vgl. Abb. 9, (F)) oder das Medikament Riluzol (Vgl. Abb. 9, (B)) anzuführen.

Das Versuchsmittel BL-1249 weist strukturelle Ähnlichkeit zu einigen nicht-steroidalen Antiphlogistika, nämlich den Anthranilsäurederivaten (Flufenamin-, Mefenamin- und Nifluminsäure) auf. Im Kontext der Untersuchung dieser Cyclooxygenase-Hemmer in ihrer Wirkung auf den humanen TREK-1-Kanal wurden im Jahr 2014 ebenfalls das Medikament Diclofenac und das Versuchsmittel BL-1249 getestet, wobei sich BL-1249 als außerordentlich potenter Aktivator erwies (Veale et al., 2014). BL-1249 wurde erstmals 2005 als mutmaßlicher Kaliumkanalagonist in glatten Muskelzellen der Blase beschrieben (Tertyshnikova et al., 2005).

Als dem BL-1249 strukturell ähnliche Verbindung fiel das zur chemischen Gruppe der Benzothiazole gehörende und antikonvulsiv, sedativ und antiischämisch wirkende Riluzol auf, das heute zur Behandlung der amyotrophen Lateralsklerose eingesetzt wird. Es ist bisher als TREK-1- und TRAAK-Agonist bekannt (Duprat et al., 2000).

Die bislang noch nicht an Ionenkanälen getestete Carbazol-Verbindung 3-(3,6-Dichloro-carbazol-9-yl)-propan-1,2-diol wurde ebenfalls aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu BL-1249 in die Experimente eingeschlossen (Vgl. Abb. 9, (C)). Das Pharmakon 2-APB ist sowohl als Inhibitor der IP_3 -Rezeptor-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung bekannt (Maruyama et al., 1997), als auch als Aktivator für TRP-Kanäle, obwohl bei höheren Konzentrationen für TRPV-1, -2 und -3 eine blockierende Wirkung nachgewiesen werden konnte (Hu et al., 2004). Die Zweiporendomänen-Kaliumkanäle TREK-1, TREK-2 und TRAAK werden ebenfalls aktiviert (Beltran et al., 2013).

Strukturell verwandt zu 2- APB stellt sich die chemische Verbindung DPBA (Diphenylboranyloxy- (diphenyl)boran) dar (Vgl. Abb. 9, (E)), welche als TRPV-3- Aktivator beschrieben wurde (Chung et al., 2005). Das spasmolytisch wirkende Anticholinergikum Drofenin zeigt ebenfalls eine strukturellen Analogie zu 2- APB und wurde bisher wie DPBA als ebenfalls aktivierend auf den TRPV- 3- Kanal wirkend beschrieben (Deering-Rice et al., 2014).

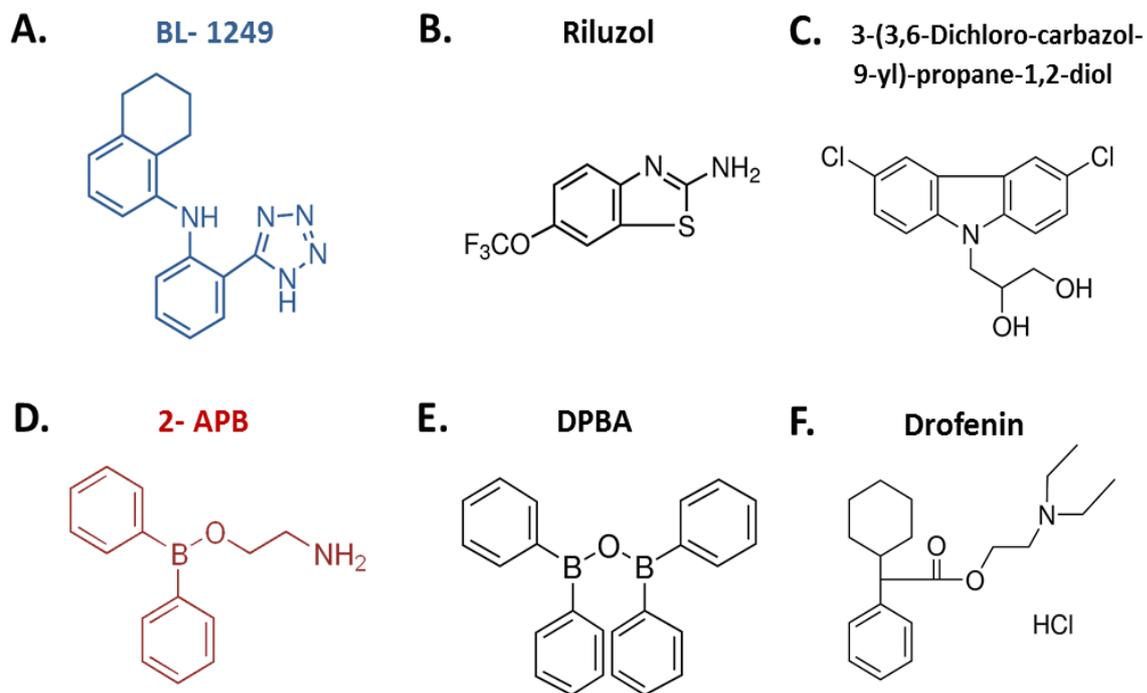


Abb. 9: Strukturformeln der verwendeten Pharmaka. (A) BL- 1249 (B) Riluzol (C) 3-(3,6-Dichloro-carbazol-9-yl)-propan-1,2-diol (D) 2- APB (E) DPBA (F) Drofenin

Im Folgenden wurde zunächst eine umfassende Charakterisierung der Wirkung dieser Substanzen auf verschiedene K_{2P} - Kanäle vorgenommen. Begonnen wurde mit der gründlichen Untersuchung des als TREK- 1- Aktivator beschriebenen BL- 1249 hinsichtlich seines Wirkspektrums in der Familie der K_{2P} - Kanäle. Versuche mit den weiteren in diesem Absatz beschriebenen Pharmaka bezüglich ihrer Wirkung auf einige ausgewählte K_{2P} -Kanäle schlossen sich an. Aufgrund der hochpotenten Wirkung des BL- 1249 wurden die Experimente auf diese Substanz konzentriert mit dem Ziel den Wirkmechanismus aufzuklären und die Bindungsstelle zu lokalisieren.

3.1 Untersuchung des TREK- 1- Aktivators BL- 1249 hinsichtlich seines Wirkspektrums in der Familie der K_{2P}- Kanäle

Wie nachfolgenden gezeigt wird, wurde BL- 1249 in seiner Wirkung und Affinität auf alle bisher in *Xenopus laevis*- Oozyten exprimierbaren K_{2P}- Kanälen untersucht. Dies waren die Kanäle TREK- 1, TREK- 2, TRAAK, TALK- 2, THIK- 1, TASK- 1, TASK- 3 und TRESK.

Durch die Applikation von BL- 1249 in verschiedenen Konzentrationen konnte dessen Affinität für jeden Kanal spezifisch bestimmt werden. Bei einer antagonistischen Wirkung wurde die mittlere Inhibitionskonstante (IC₅₀), bei einer agonistischen Wirkung die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) ermittelt.

Die Berechnungen wurden mithilfe der Hill- Gleichung durchgeführt, welche die mathematische Charakterisierung von allosterischen Wechselwirkungen an Proteinen ermöglicht. Zuvor wurden die Stromantworten auf den Maximalstrom normalisiert.

$$I/I_{\max} = \frac{1}{1 + \left\{ \frac{X}{X_{1/2}} \right\}^H}$$

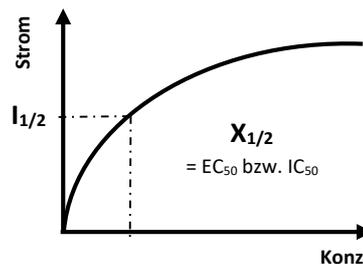
I= Strom bei Applikation von X

I_{max}= Strommaximum

X= Konzentration der applizierten Substanz

X_{1/2}= Konzentration für einen halbmaximalen Effekt → EC₅₀ bzw. IC₅₀

H= Hill-Koeffizient



Des Weiteren wurde der sogenannte fold change als Maß für die kanalspezifische Potenz der Aktivierung ausgewertet, welcher beschreibt, um welchen Faktor sich die Stromantwort vom initialen Level zur maximalen Aktivierung verändert:

$$\text{fold change} = \frac{I_{\max}}{I_K}$$

I_K= Kontrollstrom: Stromantwort unter standardisierten Ausgangsbedingungen

I_{max}= Strommaximum

Zur Kontrolle der Patchqualität wurde der bereits lange etablierte gut reversible Kaliumkanalblocker Tetrapentylammoniumbromid (TPA) eingesetzt. Es wurde jeweils eine Konzentration ausgewählt, welche weit über dem kanalspezifischen IC₅₀ liegt und einen

vollständigen Block des Kanalstroms bewirkte, sodass der verbleibende Strom einem Leckstrom zwischen Membranpatch und Pipette zugeschrieben werden konnte. Zur Quantifizierung der Aktivierung und Kontrolle der Expressionslevel der Ionenkanäle im Patch diente das Ion Rubidium (Rb^+). Der Ersatz des intrazellulären Kaliums durch Rubidium führt bei positiven Membranspannungen zu einer starken Aktivierung des Kanalstroms durch Öffnung des Selektivitätsfilters (Schewe et al.).

3.1.1 TREK- Subfamilie

Zur Bestimmung der BL- 1249- Konzentration mit welcher sich eine halbmaximale Kanalaktivierung erreichen lässt, wurden nacheinander verschiedene Konzentrationen appliziert. Begonnen wurde mit sehr niedrigen Konzentration, die keine bzw. nur eine geringe Aktivierung bewirkten und angestrebt, dass sich bei den höchsten Konzentrationen ein Plateau, also eine Sättigung der Kanalaktivität einstellte. Als Beispiel ist die gezeigte Trace zur Aufnahme einer Dosis- Wirkungsbeziehung für den humanen TREK- 1 anzusehen (Abb. 9, (A)): Die Kanaloffenwahrscheinlichkeit bei Perfusion der Zytosolseite des Patches mit der Standard-Badlösung bei einer Klemmspannung von +40 mV stellte die Ausgangssituation aller Messungen dar. Die Auswärtstriebkraft für Kaliumionen resultiert in dieser Konstellation aus den asymmetrischen physiologischen Kaliumkonzentrationen bei einem Membranpotenzial von +40 mV. Um nun diesen Auswärtsstrom durch den im Membranpatch überexprimierten hTREK- 1- Kanal von einem Leckstrom zu unterscheiden, wurde der Kanal mit dem reversiblen Blocker TPA inhibiert. Dieser Leckstrom war in der Regel sehr klein im Vergleich zum BL- 1249 aktivierten Strom.

Nach Rückführung des Patches zur Badlösung begann die Applikation der niedrigsten Konzentration vom 0,01 μM BL- 1249. Der Wechsel zur nächst höheren Konzentration fand bei Erreichen des Maximums der konzentrationsabhängigen Stromantwort statt. Beim Übergang von 100 μM zu 200 μM BL- 1249 war keine stark zunehmende Kanalaktivierung in Korrelation zur Konzentrationserhöhung mehr detektierbar, so dass geschlussfolgert werden kann, dass der Kanal bei 100 μM mit BL- 1249 annähernd maximal aktiviert vorlag.

Der humane TREK- 1- Kanal wies bei einer Konzentration von 5 $\mu M \pm 1$ eine halbmaximale Aktivierung auf; der EC_{50} - Wert wurde mit der Hill- Funktion bestimmt (Abb. 10, (B)). Der fold change der maximalen BL- 1249- Aktivierung stellte sich bezogen auf den initialen Grundstrom

bei +40 mV unter physiologischen Kaliumkonzentrationen mit einem Faktor von 23 ± 10 dar (Abb. 10, (C/D)).

Der Rattenklon des TREK- 1 wurde durch BL- 1249 ähnlich dem humanen Kanal von $3 \mu\text{M} \pm 2$ halbmaximal aktiviert. Die durchschnittliche maximale Aktivierung mit BL- 1249 fiel bemerkenswerterweise mit einem Faktor von 214 ± 27 im Vergleich zum humanen Klon fast zehnfach stärker aus (Abb. 10, (C/D)).

Der humane TREK- 2- Kanal zeigt eine hohe strukturelle Übereinstimmung in seiner Aminosäuresequenz mit dem hTREK- 1- Kanal. Auch hier ließ sich ein niedriger mikromolarer EC_{50} - Wert von $4 \mu\text{M} \pm 1$ bestimmen, wobei schon bei $10 \mu\text{M}$ BL- 1249 eine Sättigung der Aktivierung des Kanals erreicht war. Der fold change des Faktors 24 ± 6 lag im Bereich des EC_{50} des humanen TREK- 1- Kanals (Abb. 10, (C/D)).

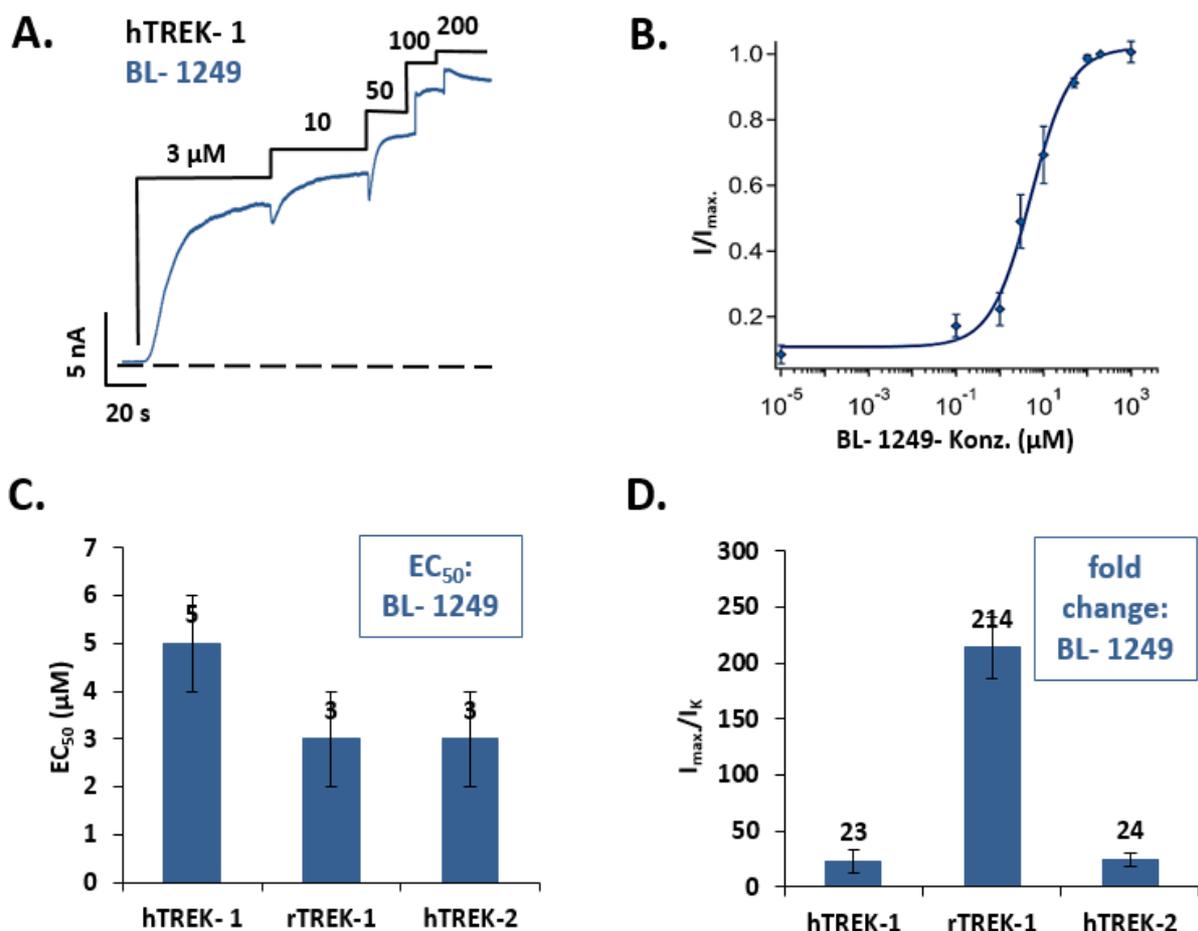


Abb. 10: Einfluss von BL- 1249 auf die TREK- Subfamilie. (A) Repräsentative Aktivierung des hTREK- 1- Kanals bei unterschiedlichen Konzentrationen von BL- 1249. (B) Dosis- Wirkungsbeziehung aus Experimenten vergleichbar mit (A) für hTREK- 1 analysiert mittels Hill- Funktion. (C) EC_{50} - Werte von hTREK- 1 ($5 \mu\text{M} \pm 1$; $n=5$), rTREK- 1 ($3 \mu\text{M} \pm 2$; $n=6$) und hTREK- 2 ($3 \mu\text{M} \pm 1$; $n=5$) im Vergleich. (D) Durchschnittliche Aktivierung ($I_{\text{max}}/I_{\text{k}}$ = fold change) von hTREK- 1 (23 ± 10 ; $n=5$), rTREK- 1 (214 ± 27 ; $n=6$) und hTREK- 2 (24 ± 6 ; $n=5$)

3.1.2 hTALK- 2

Am humanen TALK- 2- Kanal ergab die Analyse mittels der Hill- Gleichung einen EC_{50} - Wert von $56 \mu\text{M} \pm 5$ und einem hohen fold change des Faktors 235 ± 49 . Dieser resultierte einerseits aus der starken Aktivierung, andererseits aus der Tatsache, dass der hTALK- 2 unter den Ausgangsbedingungen nahezu geschlossen vorlag (Abb. 11, (A/B/E/F)).

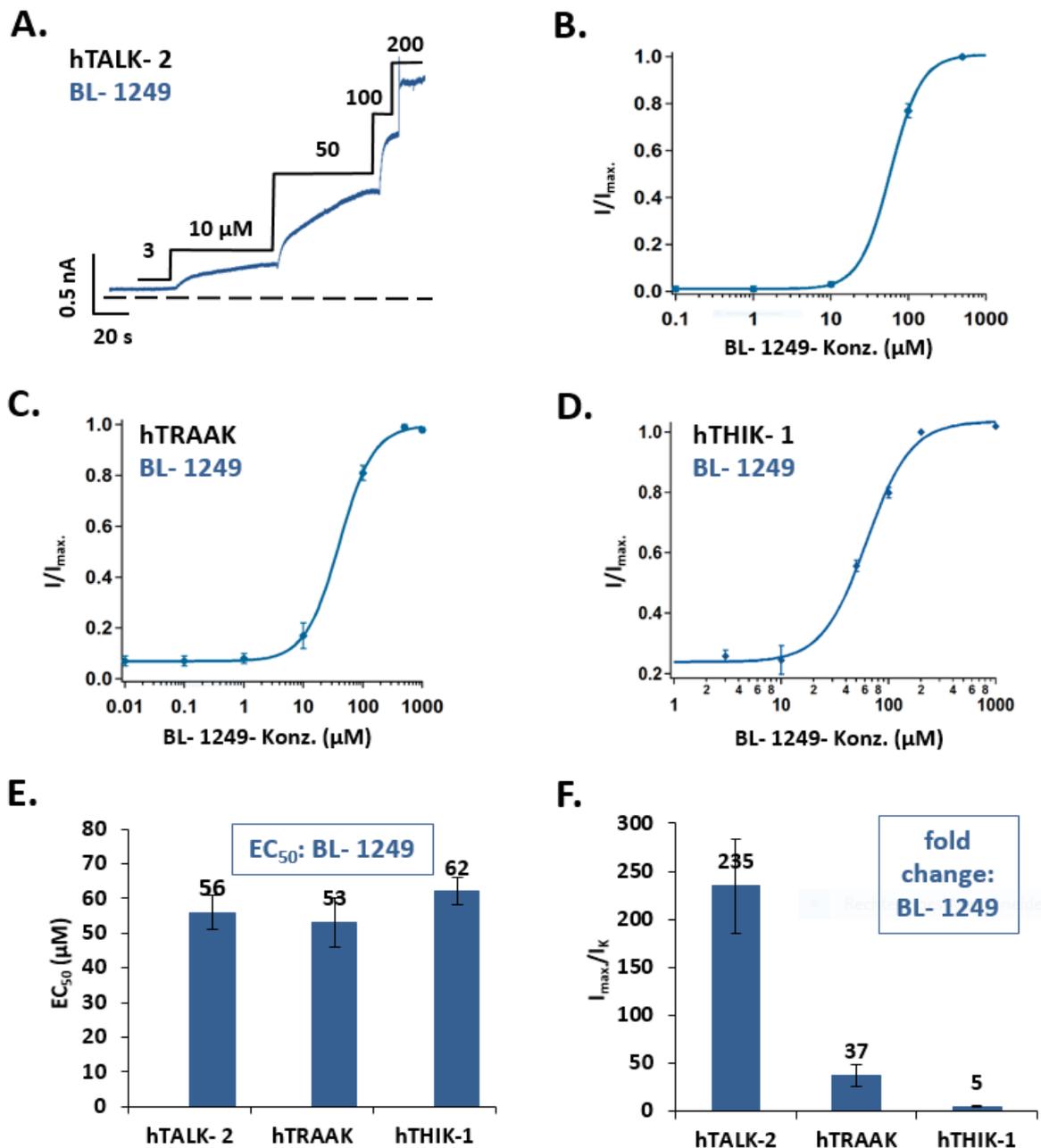


Abb. 11: Einfluss von BL- 1249 auf hTALK- 2, hTRAAK und hTHIK- 1. (A) Repräsentative Aktivierung des hTALK- 2 durch die angegeben unterschiedliche Konzentrationen von BL- 1249. **(B)** Dosis- Wirkungsbeziehung aus Experimenten wie (A) für hTALK-2 analysiert mittels Hill- Funktion. **(C)** wie (B): für hTRAAK **(D)** wie (B): für hTHIK- 1. **(E)** EC_{50} - Werte von hTALK- 2 ($EC_{50} = 56 \mu\text{M} \pm 5$; $n = 16$), hTRAAK ($EC_{50} = 53 \mu\text{M} \pm 6,80$; $n = 11$) und hTHIK- 1 ($EC_{50} = 63 \mu\text{M} \pm 4$; $n = 5$) im Vergleich. **(F)** Durchschnittliche Aktivierung (fold change) von hTALK- 2 (235 ± 49 ; $n=16$), hTRAAK (37 ± 11 ; $n=11$) und hTHIK- 1 (5 ± 1 ; $n=5$).

3.1.3 hTRAAK

Ebenfalls sehr affin zu BL- 1249 im bereits niedrigen mikromolaren Bereich stellte sich der humane TRAAK- Kanal mit einem EC_{50} von $53 \pm 7 \mu\text{M}$ dar (Vgl. Abb. 11, (C)). Es zeigte sich eine durchschnittliche Aktivierung eines Faktors von 37 ± 11 (Abb. 11, (E/F)).

3.1.4 hTHIK- 1

Für diesen K_{2P} - Kanal wurde bisher noch kein Aktivator entdeckt. Wie in Abbildung 11, D/E/F gezeigt, aktiviert BL- 1249 den hTHIK- 1- Kanal mit einem EC_{50} - Wert von $63 \mu\text{M} \pm 4$; es zeigt sich also eine ähnliche Affinität wie beim hTALK- 2- Kanal. Der hTHIK- 1- Kanal wies eine durchschnittliche maximale BL-1249- Aktivierung des Faktors 5 ± 1 auf.

3.1.5 Zusammenfassender Vergleich derjenigen K_{2P} - Kanäle, auf welche BL- 1249 einen agonistischen Effekt zeigt

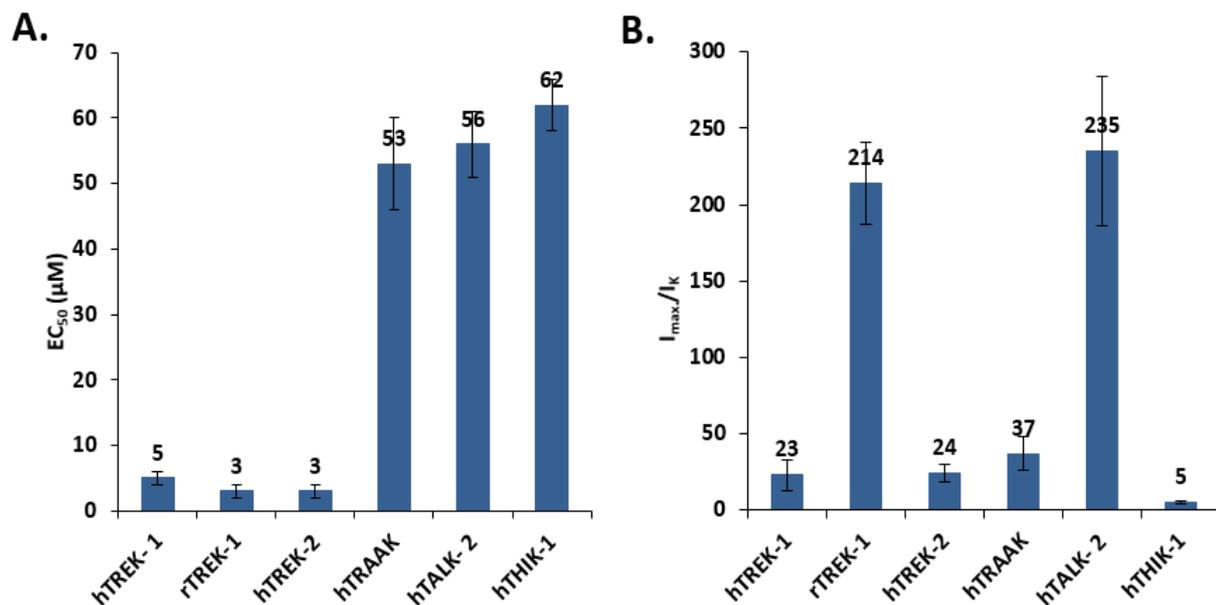


Abb. 12: Darstellung der (A) EC_{50} - Werte und der (B) durchschnittlichen Maximalaktivierung (fold change) der durch BL-1249 aktivierbaren K_{2P} - Kanäle.

Das Balkendiagramm Abbildung 12, (A) verdeutlicht die unterschiedlichen Affinitäten zwischen der hochsensitiv auf BL- 1249 reagierenden TREK- Kanälen auf der einen Seite und TRAAK, TALK- 2 sowie hTHIK- 1 auf der anderen Seite, deren halbmaximale Aktivierung erst bei der 10- bis 20- fachen Konzentration erreicht wurde. Bei der durchschnittlichen Maximalaktivierung fielen der rTREK- 1 und hTALK- 2 mit einer extremen Potenzierung auf (Abb. 12, (B)).

3.1.6 hTASK- Subfamilie

Im Gegensatz zu den bisher gezeigten K_{2P} - Kanälen wurden die humanen TASK- Kanäle durch BL- 1249 mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50} - Wert) von $13 \mu M \pm 2$ (hTASK- 1) bzw. $5 \mu M \pm 1$ (hTASK- 3) inhibiert. Bei einer Konzentration von $200 \mu M$ war der Strom annähernd vollständig blockiert (Vgl. Abb. 13, (A)).

3.1.7 hTRESK

Mit einem IC_{50} - Wert von $12 \mu M \pm 3$ zeigte auch der hTRESK- Kanal, wie die hTASK- Kanäle eine Strominhibition bei Applikation von BL- 1249 . Bei einer BL- 1249- Konzentration von 1 mM war noch ein geringer Reststrom vorhanden. Dieser war vollständig mit TPA zu blockieren, wodurch ein Leckstrom des Patches als Ursache ausgeschlossen werden konnte (Abb. 13, (C/D/E)).

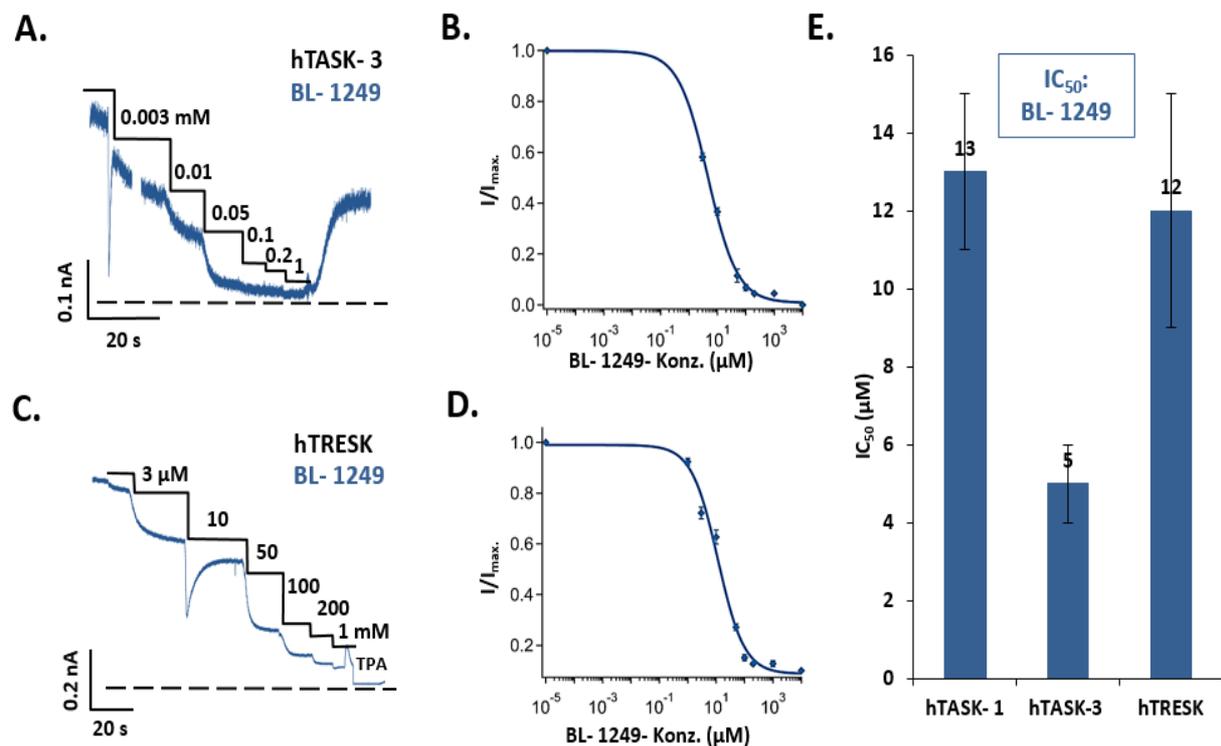


Abb. 13: Einfluss von BL- 1249 auf hTASK- 1, hTASK- 3 und hTRESK. (A) Repräsentative Inhibition des hTASK- 3- Kanals durch die angegebenen unterschiedliche Konzentrationen von BL- 1249. **(B)** Dosis- Wirkungsbeziehung aus Experimenten wie (A) für hTASK- 3; analysiert mittels Hill- Funktion. **(C)** wie (A): für hTRESK **(D)** wie (B): für hTRESK **(E)** Vergleich der IC_{50} - Werte von hTASK- 1 ($IC_{50} = 13 \mu M \pm 2$; $n = 3$), hTASK- 3 ($IC_{50} = 5 \mu M \pm 1$; $n = 4$) und hTRESK ($IC_{50} = 12 \mu M \pm 3$; $n = 5$).

3.2 Charakterisierung der Wirkung weiterer Pharmaka an ausgewählten K_{2P} -Kanälen

Das Pharmakon 2- Aminoethoxydiphenylborat (2- APB) wurde als Agonist der K_{2P} - Kanäle TREK- 1, TREK- 2 und TRAAK bereits beschrieben (Beltran et al., 2013). Nachfolgend wird die Wirkung von 2- APB auf die K_{2P} - Kanäle rTREK- 1, hTREK- 2 und hTALK- 2 gezeigt. Zudem wurden die 2- APB- Strukturanaloga und TRPV-3- Aktivatoren DPBA (Diphenylboranyloxy-(diphenyl)boran) (Chung et al., 2005) und Drofenin (Deering-Rice et al., 2014) in ihrer Wirkung auf den K_{2P} - Kanal hTREK- 2 untersucht. Aufgrund einer strukturellen Ähnlichkeit zu BL- 1249 wurden das zur chemischen Gruppe der Benzothiazole gehörende Medikament Riluzol, welches bisher als TREK- 1- und TRAAK- Agonist bekannt ist (Duprat et al., 2000) und die bislang noch nicht an Ionenkanälen getestete Carbazol- Verbindung 3-(3,6-Dichloro-carbazol-9-yl)-propane-1,2-diol zusätzlich ausgewählt, um ihre Wirkung zu charakterisieren.

3.2.1 2- APB

Folgende EC_{50} - Wert wurden bisher in aktuellen Publikationen für 2- APB angegeben: Bei einer 2- APB- Konzentration von $486 \mu\text{M} \pm 135$ wurde die halbmaximal Aktivierung von TREK- 1 erreicht, bei $1,22 \text{ mM} \pm 0,39$ für TREK- 2. Beim TRAAK konnte aufgrund einer fehlenden Sättigung der Kanalaktivierung kein EC_{50} - Wert errechnet werden; eine eindeutig Dosis- abhängige Aktivierung wurde dennoch gezeigt (Beltran et al., 2013).

Eine aktivierende Wirkung von 2- APB am TREK- 1- Kanal konnte in dieser Arbeit in Übereinstimmung mit bestehenden Publikationen nachgewiesen und experimentell eine halbmaximale Aktivierung bei der Konzentration $388 \mu\text{M} \pm 23$ definiert werden (Beltran et al., 2013). Abbildung 14, (A) zeigt die Auswertung der Dosis- Wirkungsbeziehung mithilfe der Hill- Gleichung. Für TREK- 2 konnte ebenfalls eine Aktivierung bei Applikation von 2- APB mit einer Konzentration von 1 mM übereinstimmend mit aktuellen Publikationen aufgezeichnet werden (Zhuo et al., 2015, Beltran et al., 2013).

In dieser Arbeit konnte zudem für den humanen TALK- 2- Kanal eine 2- APB- Aktivierung gezeigt werden. Ab einer Konzentration von 3 mM konnte keine Zunahme des Kaliumstroms in Korrelation zur Konzentrationserhöhung mehr gesehen werden, sodass hier das

Sättigungsplateau erreicht wurde und somit ein sigmoidaler Fit dargestellt werden konnte (Abb. 14, (B)). Der EC_{50} -Wert errechnete sich bei $1,53 \text{ mM} \pm 0,33$.

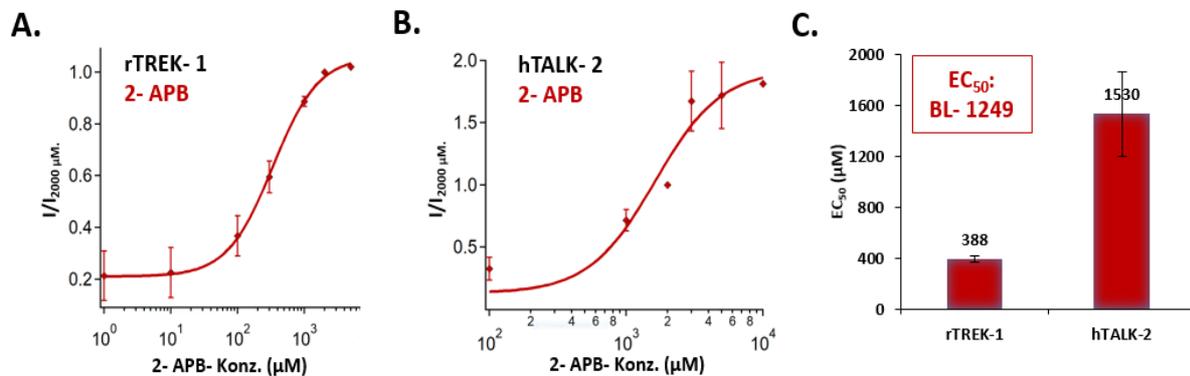


Abb. 14: Einfluss von 2- APB auf rTREK- 1 und hTALK- 2. (A) Dosis- Wirkungsbeziehung für rTREK- 1 analysiert mittels Hill- Funktion. **(B)** wie (A.): für hTALK-2. **(C)** Vergleich der EC_{50} - Werte von rTREK- 1 ($EC_{50} = 388 \mu\text{M} \pm 23$; $n = 5$) und hTALK- 2 ($EC_{50} = 1530 \mu\text{M} \pm 330$; $n = 5$).

3.2.2 DPBA

Für die als TRPV- 3- Aktivator beschriebene Verbindung Diphenylboranyloxy(diphenyl)boran (DPBA) konnte ebenfalls erstmals am exemplarisch gewählten K_{2P} - Kanal hTREK- 2 ein agonistischer Effekt aufgezeigt werden. In der abgebildeten Trace (Abb. 15, (A)) wird die DPBA- Aktivierung dargestellt, welche sich biphasisch mit einer instantan- aktivierenden und einer kontinuierlich ansteigenden Komponente charakterisierte.

3.2.3 Drofenin

Das Anticholinergikum Drofenin bewirkte bei einer Konzentration von 1 mM einen fast kompletten, instantanen Block des Kaliumstroms vom humanen TREK- 2- Kanal. Der Auswasch stellte sich exponentiell und vollständig reversibel mit Wiederherstellung des Ausgangstroms nach Ende der Applikation dar (Abb. 15, (A)) und ist somit als neuer hTREK- 2- Kanalblocker anzusehen.

3.2.4 Riluzol und 3-(3,6-Dichloro-carbazol-9-yl)-propane-1,2-diol

Am rTREK- 1- Kanal konnte die in der vorliegenden Arbeit erstmalig an K_{2P} - Kanälen getestete Carbazol- Verbindung 3-(3,6-Dichloro-carbazol-9-yl)-propane-1,2-diol eine von der applizierten Konzentration abhängige Aktivierung gezeigt werden (Abb. 15, (B)). Die in

Publikationen bereits beschriebene agonistische Wirkung von Riluzol am TREK- Kanal konnte ebenfalls reproduziert werden.

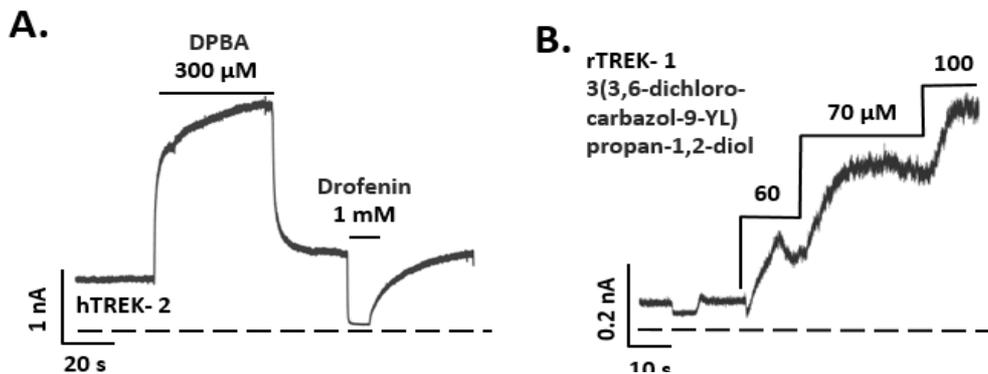


Abb. 15: Wirkung weiterer Pharmaka. (A) Die Trace zeigt die agonistische Wirkung des DPBA und den blockierende Effekt von Drofenin am hTREK- 2. Der K_{2P} - Kanal hTREK- 2 wurde initial bei +40 mV mittels eines kontinuierlichen Pulses geklemmt. Nach Auswasch des DPBA wurde Drofenin (1 mM) appliziert, welches den Kanal vollständig blockierte (n= 4). **(B)** Die Trace verdeutlicht die agonistische konzentrationsabhängige Wirkung des 3-(3,6-Dichloro-carbazol-9-yl)-propan-1,2-diol am rTREK- 1. Initial wurde rTREK- 1 bei +40 mV in einem kontinuierlichen Puls zur Patchkontrolle mit TPA (1 mM) blockiert; es folgte die Aktivierung des Kanals mit den angegebenen Konzentrationen (n= 6).

3.3 Aufklärung des Wirkmechanismus von BL-1249

Zur Aufklärung der Fragestellung welche Domänen der K_{2P} - Kanäle an der Vermittlung der Wirkung des BL- 1249 an K_{2P} - Kanälen beteiligt sind, wurde initial eine trunkierte Form des hTREK- 2 eingesetzt, welche eine Deletion des Carboxy-, sowie des Aminoterminus aufweist (Dong et al., 2015). Eine BL- 1249- Aktivierung war in den Experimenten weiterhin möglich, sodass sich die für die Aktivierung entscheidende Region nicht den zytoplasmatischen Resten, sondern dem Bereich der Transmembrandomänen zuordnen ließ.

Folgend wurden verschiedene K_{2P} - Kanalblocker, deren Wirkmechanismen und Bindungsstellen im Kanal bereits etabliert sind, in Konkurrenz zu BL-1249 getestet. Diese Antagonisten fungierten somit als Werkzeug auf dem Weg zur Aufklärung der BL- 1249- Wirkungsweise. Ausgewählt wurden Inhibitoren, die potent inhibieren und deren Bindungsstellen sich in der Kanalkavität kurz unterhalb des Selektivitätsfilters befinden. Diese Kriterien wurden von Tetrapentylammoniumbromid (TPA) und Norfluoxetin (NFX) erfüllt. Quartanäre Ammoniumionen, zu denen das TPA zählt, wurden bereits als Blocker für diverse Kaliumkanäle etabliert. Sie sind wertvolle Hilfsmittel bei der Erforschung der Porenstruktur, sowie von Wirkmechanismen und Struktur- Funktionsbeziehungen an Kaliumkanälen (Baukowitz and Yellen, 1996). Die K_{2P} - Familie wurde zunächst als insensitiv für den Block mit

quartären Ammoniumverbindungen beschrieben, weil das am häufigsten genutzte Tetraethylammoniumbromid (TEA) diese nur sehr gering inhibiert (Lotshaw, 2007).

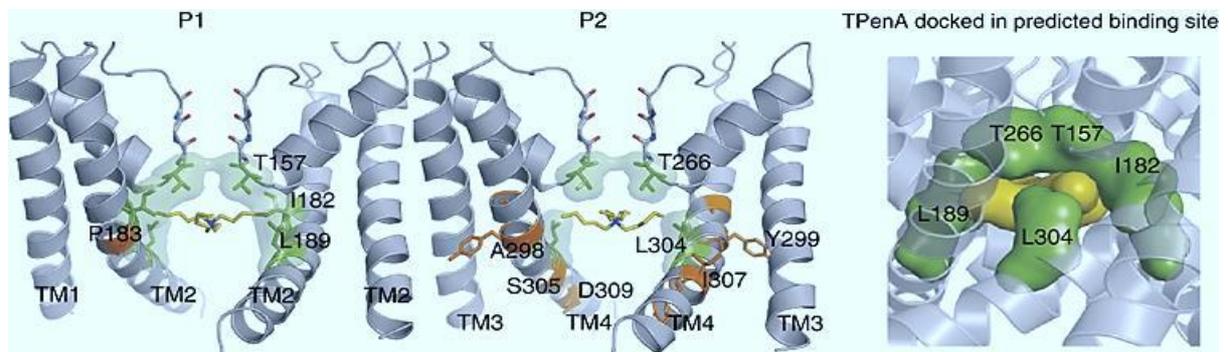


Abb. 16: TPA in seiner Bindungsstelle am TREK- 1- Kanal. Die Seitenreste, welche die Bindung beeinflussen, sind markiert. Grün sind die direkt an der Bindung beteiligten Reste gezeigt. Orange sind die Reste dargestellt, die indirekt auf die Bindung wirken. Rechts ist die Bindung von TPA (gelb) an die korrespondierenden Aminosäurereste (grün) abgebildet (Abbildung übernommen aus Piechotta et al., 2011).

TPA dagegen inhibiert jedoch reversibel und potent die Mehrheit der K_{2P^-} Kanäle. Als Bindungsstelle des TPA wurden folgende Reste identifiziert, welche auch in Abbildung 16 dargestellt sind:

T157 innerhalb der ersten Porendomäne (P1), im Transmembransegment 2 (TM2) die Aminosäuren I182 und L189, sowie in P2 T266 und in TM4 L304 (Piechotta et al., 2011).

Die BL- 1249- Dosis- Wirkungsbeziehung unter dauerhafter TPA- Applikation zeigte eine deutliche Verschiebung des EC_{50} - Werts hin zu höheren Konzentrationen, was auf eine direkte Konkurrenz der beiden Moleküle um eine Bindungsstelle hindeutete, die somit im Bereich der Porenkavität direkt unterhalb des Selektivitätsfilters lokalisiert erschien. Im Vergleich veränderte sich die zur halbmaximalen Aktivierung benötigte Konzentration von 2- APB, dessen Bindungsstelle im zytoplasmatischen C- Terminus liegt, unter kontinuierlicher TPA- Applikation nicht.

Ein weiterer K_{2P^-} Kanalblocker, dessen Bindungsstelle in dieser Region liegt, ist der aktive Metabolit Norfluoxetin des Arzneiwirkstoffs Fluoxetin des antidepressiv wirkenden selektiven Serotonin- Wiederaufnahme- Hemmers (SSRI) Prozac (Dong et al., 2015). Auch bei diesem Blocker wurde ein eindeutiger Shift der EC_{50} - Bindungsaffinität des BL- 1249 deutlich, was die Ergebnisse des vorherigen Konkurrenzexperiments mit TPA untermauert.

Folgend werden die Ergebnisse der oben kurz beschriebenen Experimente dargestellt.

3.3.1 BL- 1249- Aktivierung des N- und C- terminal trunkierten hTREK- 2

Die trunkierte Struktur des hTREK- 2- Kanals besitzt weder einen carboxy- noch einen aminoterminalen zytoplasmatischen Rest (Abb. 17, (B)). Durch Vergleich der Regulation des Wildtypkanals und der trunkierten Form ließ sich unterscheiden, ob die zytoplasmatischen Reste eine entscheidende Rolle für die Aktivierung durch das jeweilige Pharmakon spielen. Der trunkierte Kanal war nicht mehr mit 2- APB aktivierbar. Dies stimmt mit Publikationen überein, in welchen die 2- APB- Bindungsstelle im in dieser Struktur deletierten C- Terminus beschrieben wird (Zhuo et al., 2015). Auch nach Applikation von DPBA zeigte sich keine Stromzunahme. Bei Applikation von Rubidium, welches über eine Beeinflussung des Selektivitätsfilters wirkt, blieb die instantane Aktivitätszunahme bestehen, was die Expression funktioneller Kanäle im Patch bewies. Bei Applikation von 3 μM BL- 1249 zeigte der trunkierte Kanal weiterhin eine deutliche Aktivierung (Vgl. Abb. 17, (A)).

3.3.2 Konkurrenz zwischen BL- 1249 und verschiedenen Kanalblockern

3.3.2.1 Konkurrenz zwischen BL- 1249 und TPA im rTREK- 1- Kanal

Über die gesamte Dauer des Experiments erfolgte eine kontinuierliche Applikation von TPA (100 mM). Folgend wurden zusätzlich zum TPA verschiedene BL- 1249- Konzentrationen hinzugefügt. Zunächst wurde die niedrigste Konzentration von 0,01 μM BL- 1249 in Kombination mit 100 μM TPA appliziert. Bei 200 μM war keine Sättigung der Kanalaktivität auszumachen; ohne TPA wurde bei dieser Konzentration das Plateau erreicht. Bei 3 μM , also dem ungefähren EC_{50} - Wert der Dosis- Wirkungsbeziehung ohne TPA war nur eine sehr geringe Stromantwort vorhanden. Es konnte somit eine eindeutige Verschiebung der Affinität durch Konkurrenz der Moleküle am Kanal gezeigt werden (Vgl. Abb. 17, (C/D)).

3.3.2.2 Konkurrenz zwischen BL- 1249 und Norfluoxetin

Während der Applikation der verschiedenen BL- 1249- Konzentrationen wurden kontinuierlich 100 μM Norfluoxetin appliziert. Dies führte bei 3 μM BL- 1249, dem eigentlichen EC_{50} , zu einer kaum darstellbaren Aktivierung. Eine annähernde Sättigung der Stromantwort fand bei der Erhöhung der Konzentration zu 200 μM BL- 1249 statt. Auch bei Norfluoxetin ist somit eine eindeutige Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung erkennbar (Abb. 17, (E/F)).

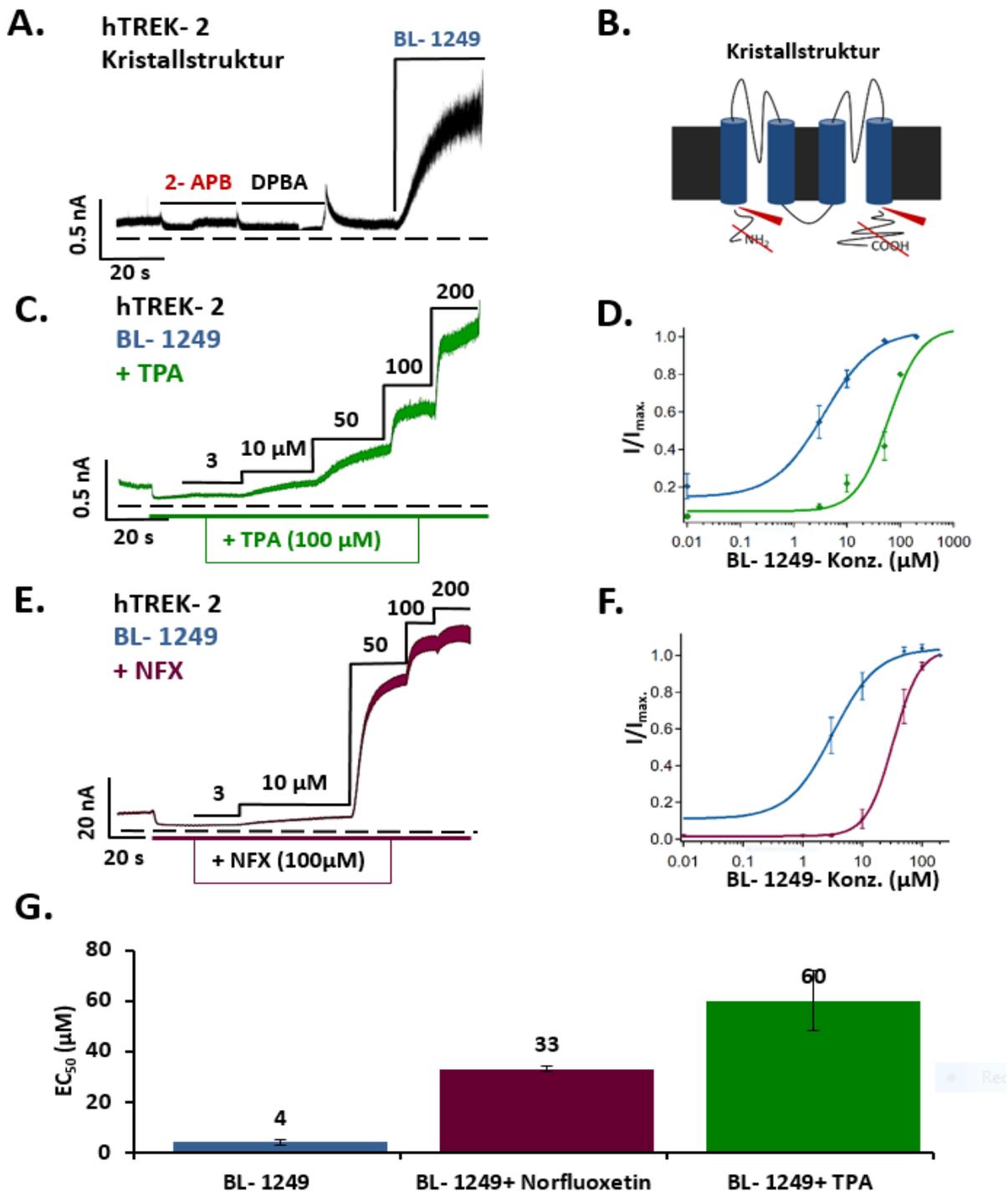


Abb. 17: Darstellung der Ergebnisse aus den Kristallstruktur- und Konkurrenzexperimenten zur Aufklärung des Wirkmechanismus und Bindungsstelle des BL-1249. (A) Aktivierungsmuster der hTREK-2-Kristallstruktur mit 2-APB (1 mM) und DPBA (300 μM), welche die Kristallstruktur im Vergleich zum ursprünglichen Kanal nicht mehr aktivierten, während die agonistische BL-1249-Wirkung (3 μM) bestehen blieb (n=3). (B) Schematische Darstellung der Kristallstruktur mit der Deletion der zytoplasmatischen Reste im Vergleich zum Wildtyp-Kanal. (C) Exemplarische Aktivierung des hTREK-2-Kanals bei einer kontinuierlichen Spannung von +40 mV durch die angegebenen unterschiedlichen Konzentrationen von BL-1249 unter gleichzeitiger kontinuierlicher Applikation von TPA (n=6). (D) Dosis-Wirkungsbeziehung aus (C) von BL-1249 (blau) und BL-1249 + TPA (grün). Eine eindeutige Rechtsverschiebung durch TPA ist erkennbar. (E) wie (C): Konkurrenz mit Norfluoxetin (NFX), anstelle von TPA (n=5). (F) wie (D): Auch die Dosis-Wirkungsbeziehung bei einer Konkurrenz von NFX mit BL-1249 zeigt eine deutliche Affinitätsabnahme. (G) Vergleichende Darstellung der EC₅₀-Werte von BL-1249, BL-1249 + NFX und BL-1249 + TPA.

3.3.3 Cysteinmutationsscan zur Identifizierung der BL- 1249- Bindungsstelle

Ein Mutationsscan beruht auf dem Grundgedanken, dass durch Austausch einer an der Bindung bzw. am Wirkmechanismus beteiligten Aminosäure im Kanalprotein die grundsätzliche Funktionalität des Kanal gewahrt bleibt, während die spezifische Bindung der Substanz am Kanal beeinflusst wird, wenn die Punktmutation an einer für die Struktur- Funktions- Beziehung kritischen Stelle eingeführt wurde. Als vergleichbare Größe kann der EC_{50} - Wert bzw. dessen Verschiebung herangezogen werden. Da die vorherigen Experimente Hinweise auf eine Lokalisation der Aminosäuresequenzabschnitte, welche zur Vermittlung der Wirkung nötig sind, im Bereich der Kavität intrazellulär des Selektivitätsfilters lieferten, wurden Mutanten dieser Region hergestellt und untersucht. Es wurde jeweils eine Cystein- Punktmutation eingeführt. Die Mutationen werden folgendermaßen gekennzeichnet: Es wird die Stelle der Punktmutation in der Aminosäuresequenz des Kanals genannt und die ursprüngliche Aminosäure vor diese Zahl gestellt, während das eingeführte Cystein dahinter steht. Beispielsweise bedeutet die Abkürzung L304C, dass das Leucin an Stelle 304 zu Cystein mutiert wurde. Die im Einbuchstaben- Code verwendeten Abkürzungen lauten: A (Alanin), C (Cystein), F (Phenylalanin), G (Glycin), L (Leucin), M (Methionin), S (Serin), T (Threonin), V (Valin), W (Tryptophan).

3.3.3.1 Lokalisation der BL- 1249- Bindungsstelle im Porenbereich von rTREK- 1

Es wurden Aminosäuren zwischen der Stelle 299 bis zur Aminosäure 310 in der Sequenz des rTREK- 1- Kanals systematisch durch Cystein ausgetauscht und untersucht, sowie ein Threonin an Stelle 157, welches als kritisch für die Spannungsabhängigkeit entdeckt wurde (Schewe et al.). Im Zuge der Experimente waren drei Mutanten durch eine signifikante Verschiebung der BL- 1249- Affinität auffällig. Der Austausch des Tyrosins der Sequenzstelle 299 bewirkte eine Verschiebung der Affinität um den Faktor 22 auf einen EC_{50} von $71 \mu\text{M} \pm 2$. Eine Beeinflussung offenbarte ebenso die Mutation des Leucins 304 mit einer Erhöhung des EC_{50} auf $79 \mu\text{M} \pm 13$, was damit einen Shift um den Faktor 24 bedeutete (Abb. 18, (B)). Das direkt zu diesem Leucin benachbarte Serin 305 stellte sich ebenfalls als die BL- 1249- Wirkung beeinflussend dar mit einer Erhöhung der Affinität um Faktor 13 bei einem EC_{50} von $42 \mu\text{M} \pm 4$. Einige der weiteren untersuchten Mutanten wiesen eine der des Wildtyp- Kanals sehr ähnliche Affinität auf, wie die Mutationen des Methionins 306, des Tryptophans 310 oder des Threonins 157. Geringfügig beeinflusst mit einem nur drei- bis sechsfachen Shift der Affinität zeigten sich die

Mutanten des Phenylalanins 300, des Alanins 301, des Valins 303, des Threonins 307, des Glycins 308 und der Asparaginsäure an Stelle 309 (Vgl. Abb. 18, (A)).

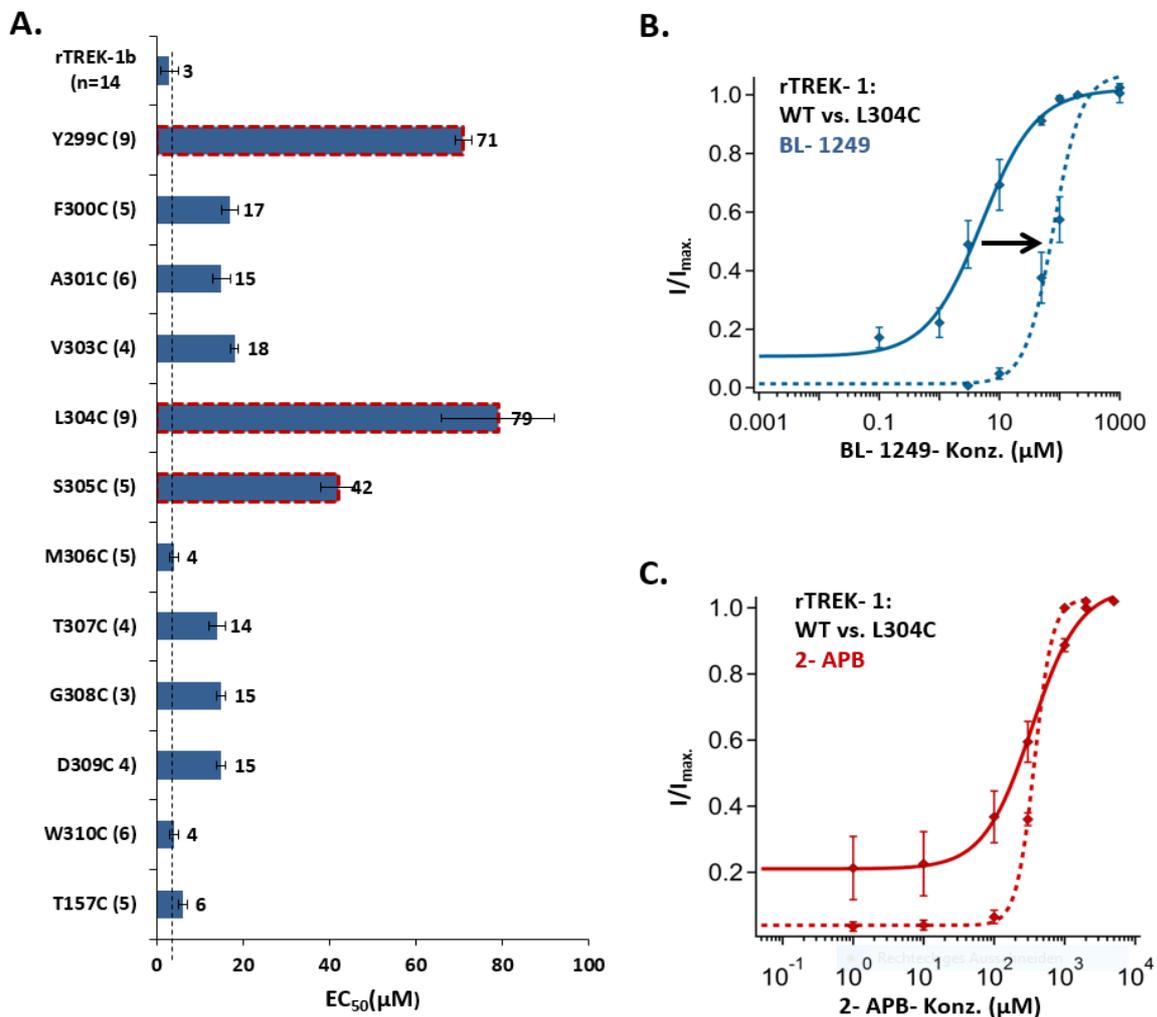


Abb. 18: Cystein- Punktmutationen beeinflussen die Bindungsaffinität des BL- 1249 am rTREK- 1- Kanal. (A) Das Balkendiagramm zeigt die EC₅₀- Werte der gemessenen Mutanten im Vergleich. Eine beachtenswerte Affinitätsabnahme ist bei den Mutanten Y299C, L304C und S305C (rot eingerahmt) zu beobachten. Die weiteren Mutanten zeigen keine oder nur eine geringe Affinitätsminderung. **(B)** Die Mutation des Leucin 304 (blau gestrichelt) zu Cystein führte im Vergleich zum Wildtyp- rTREK- 1- Kanal (blau durchgängig) zu einer Rechtsverschiebung der Dosis- Wirkungsbeziehung von BL- 1249 (EC₅₀: WT 3 μM ± 2; L304C 79 μM ± 13). **(C)** Die 2- APB- Aktivierung wird nicht durch die Mutation des L304 zu Cystein (rot gestrichelt) im Vergleich zum Wildtyp- Kanal (rot durchgängig) beeinflusst. Die Affinität verändert sich nicht entscheidend (EC₅₀: WT 338 ± 23, n=5; 372 ± 10, n=5).

3.3.3.2 Einfluss der L304C- Mutation im rTREK- 1 auf die 2- APB- Aktivierung

Für 2- APB wird die Bindungsstelle im zytoplasmatischen Carboxyterminus beschrieben (Zhuo et al., 2015). Es wurden der EC₅₀ des Wildtyp- rTREK- 1- Kanals bestimmt und mit der Affinität von L304C verglichen. Bei 2- APB konnte wie erwartet keine signifikante Affinitätsverschiebung bei dieser Mutante gezeigt werden (Abb. 18, (C)).

4. Diskussion

4.1 BL- 1249: Aufklärung von Bindungsstelle und Wirkmechanismus

Die Regulation von Kaliumkanälen durch Pharmaka wurde in den letzten Jahren intensiv beforscht. Insbesondere die Aktivierung von K_{2P} - Kanälen bildet einen interessanten Ansatz um die zelluläre Erregbarkeit zu regulieren und therapeutische Optionen für Erkrankungen zu entwickeln. In dieser Arbeit wurden eine Reihe bekannter K_{2P} - Kanal- Aktivatoren untersucht: das BL- 1249, die Pharmaka Riluzol und Drofenin, sowie die drei strukturell verwandten Verbindungen 2- ABP, DPBA und die Verbindung 3-(3,6-Dichloro-carbazol-9-yl)-propan-1,2-diol. In Übereinstimmung mit der Literatur zeigen meine Ergebnisse, dass BL- 1249 der potenteste dieser Aktivatoren ist, so dass der Schwerpunkt in meiner Arbeit auf die Aufklärung von dessen Wirkmechanismus gelegt wurde. Es wurde die Wirkung von BL- 1249 auf K_{2P} - Kanäle aus den Subfamilien TREK/TRAAK, TALK, THIK und TASK untersucht. Die K_{2P} - Kanäle TREK- 1, TREK- 2, TRAAK-, TALK- 2, sowie THIK- 1 ließen sich durch BL- 1249 aktivieren. Für die K_{2P} - Kanäle TASK- 1, TASK- 3 und TRESK konnte keine Aktivierung beobachtet werden, sondern bereits im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich eine Inhibition der Kaliumstroms. Versuche mit einer trunkierten Kanalvariante des TREK- 2- Kanals (d.h. einem Kanalprotein mit Deletion des zytoplasmatischen N- und C- Terminus) zeigten einen Fortbestehen der Aktivierung durch BL- 1249. Daher wurde die Bindungsstelle von BL- 1249 nicht im zytoplasmatischen N- oder C- Terminus vermutet. Zur weiteren Eingrenzung der BL- 1249- Bindungsstelle wurden Konkurrenzexperimente von BL- 1249 mit verschiedenen Kanalinhhibitoren durchgeführt, deren Bindungsstelle bereits vorbeschrieben war: das Tetrapentylammoniumbromid (TPA) und das Norfluoxetin (NFX). Die Bindungsstelle von TPA liegt in der Porenkavität unterhalb des Selektivitätsfilters, wohingegen NFX in Seitenfenestrierungen bindet, die von der Porenkavität abzweigen. Ich konnte zeigen das TPA und NFX den EC_{50} der BL- 1249- Aktivierung eindeutig zu höheren Konzentrationen verschieben. Diese Resultate implizieren eine direkte Konkurrenz um eine überlappende Bindungsstelle unterhalb des Selektivitätsfilters. Ausgehend von diesem Ergebnis und der bekannten Kristallstruktur des TREK- 2- Kanals, habe ich eine Reihe von Cystein- Mutationen in der Nähe der mutmaßlichen Bindungsregion von BL- 1249 untersucht. Es wurden drei Mutanten in der vierten Transmembrandomäne (TM4) identifiziert, die die BL- 1249- Aktivierung deutlich reduzieren. Dies sind einerseits Mutationen von Leucin 304 und von Serin

305, welche sich dicht unterhalb des Selektivitätsfilters befinden und von Tyrosin 299, welches am Übergang zur Porendomäne lokalisiert ist (Abb. 19 und 20).

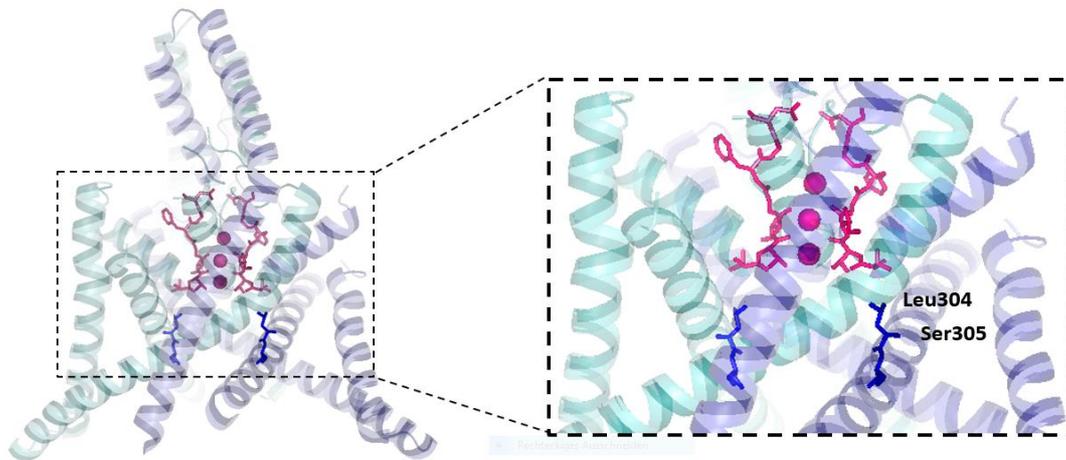


Abb. 19: Cysteinmutationen des Leucin 304 und Serin 305 bewirken eine Affinitätsabnahme von BL- 1249 im Vergleich zum Wildtyp- TREK- 1. Die beiden Untereinheiten sind in blau und türkis dargestellt. Es zeigt sich die enge räumliche Nachbarschaft von Selektivitätsfilter (pink) und den beiden kritischen Aminosäureresten (blau). PDB- Struktur: 4TWK; modifiziert mit PyMol_molecular_visualization

Die Mutation von Tyrosin 299 (Y299) führt zu einer permanenten Aktivierung des Kanals und hebt somit das Kanal gating auf. Y299 ist bereits als kritischer Rest für das Schaltverhalten von TREK- 1 vorbeschrieben (Bagriantsev et al., 2012, Lolicato et al., 2014). Die Mutationen von L304 und S305 zeigen dagegen ein normales Kanal gatingverhalten. Des Weiteren wurden L304 und S305 bereits als Interaktionsstellen des Kanalblockers TPA identifiziert (Piechotta et al., 2011). Dies ist konsistent mit dem Konzept, dass TPA und BL- 1249 um eine gemeinsame Bindungsstelle unterhalb des Selektivitätsfilters kompetieren.

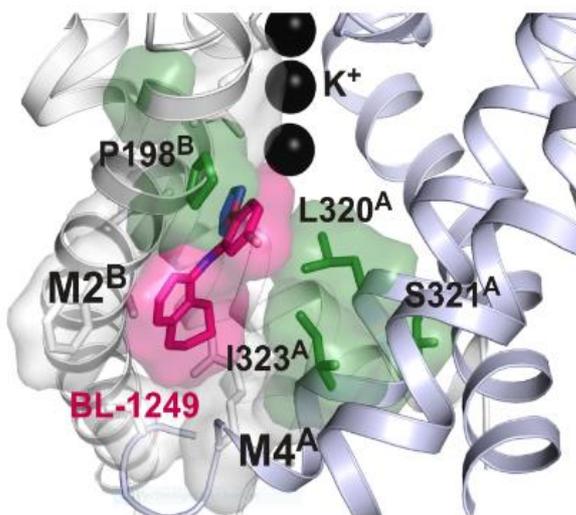


Abb. 20: Strukturelle Darstellung der favorisierten Bindungsstelle und Ausrichtung von BL- 1249 (pink) im TREK- 2-Kanal. Aminosäurereste, deren Mutation die BL- 1249- Aktivierung reduzieren, sind grün hervorgehoben. In der Abbildungsbeschriftung entsprechen L320 und S321 den von mir untersuchten Aminosäureresten L304 und S305. Diese Daten sind aus MD (molecular dynamics)- Simulationen hervorgegangen, welche in einer Kooperation durch Dr. Han Sun am FMP in Berlin durchgeführt wurden. (Abbildung übernommen aus Schewe et al., 2019, Fig. 2)

4.2 Mechanismen der Regulation von Ionenkanälen durch Pharmakabindung

Für die Substanzen 2- APB und NFX wurden in vorhergehenden Arbeiten die Mechanismen der Wirkvermittlung bereits postuliert. Diese Erkenntnisse werden im Folgenden kurz dargestellt und vergleichend mit meinen Ergebnissen zu BL- 1249 diskutiert.

4.2.1 2- APB

2- APB (2- Aminoethoxydiphenylborat) wurde zunächst als Inhibitor der IP₃- Rezeptor induzierten Kalziumfreisetzung beschrieben. Des Weiteren wirkt 2- APB in niedrigeren Konzentrationen als Aktivator bzw. in höheren Konzentrationen als Inhibitor von TRP- Kanälen (Maruyama et al., 1997, Hu et al., 2004). Später wurde zudem gezeigt, dass 2- APB auch TREK- 1, TREK- 2 und TRAAK aktiviert (Beltran et al., 2013). Ein im proximalen zytoplasmatischen C- Terminus lokalisiertes Histidin an Sequenzposition 368 im TREK- 2- Kanal wurde als Bindungsstelle für 2- APB beschrieben (Zhuo et al., 2015). Die Bindung von 2- APB bewirkt allosterisch die Öffnung des Selektivitätsfiltergates (Chemin et al., 2005, Sandoz and Levitz, 2013, Treptow and Klein, 2010, Lolicato et al., 2014, Zhuo et al., 2015).

Ich konnte erstmals zeigen, dass 2- APB nicht nur Mitglieder der TREK-/ TRAAK- Subfamilie aktiviert, sondern ebenfalls den humanen TALK- 2- Kanal. Die Bindungsstelle von 2- APB am TALK- 2 habe ich in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. In Analogie zur TREK-/ TRAAK- Subfamilie ist zu erwarten, dass 2- APB im TALK- 2- Kanal ebenfalls im C- Terminus bindet und durch einen ähnlichen Mechanismus eine Aktivierung bewirkt.

Zusätzlich habe ich das dem 2- APB strukturell verwandte DPBA untersucht und konnte zeigen, dass die Deletion des C- Terminus die Wirkung von DPBA aufhebt. Dies impliziert, dass 2- APB und DPBA beide mit einer Bindungsstelle im C- Terminus interagieren. In TRPV6- Kanälen ist die 2- APB- Bindungsstelle, wie kürzlich gezeigt wurde, in einer Tasche lokalisiert, welche aus der zytoplasmatischen Abschnitt der Transmembranhelix gebildet wird und allosterisch eine Aktivierung bzw. Inhibition des Kanals bewirkt (Singh et. al, 2018). Dies zeigt, dass in unterschiedlichen Kanalfamilien für 2- APB verschiedene Bindungsstellen vorliegen.

4.2.2 Norfluoxetin

Der aktive Metabolit des SSRIs Prozac, das Norfluoxetin (NFX), ist ein bekannter TREK- Kanalinhibitor und wirkt über einen allosterischen Mechanismus durch Stabilisierung eines

wenig aktiven Kanalzustands. In Kristallstrukturen wurden für die K_{2P} -Kanäle TREK und TRAAK zwei Zustände etabliert, die als up- und down- Zustand beschrieben werden. Beim Übergang vom up- zum down- Zustand bewegt sich die TM4- Helix Richtung extrazellulär in die Plasmamembran hinein. Im down- Zustand weist die Kanalstruktur Seitenfenestrierungen auf, die von der Pore und Kanalkavität abgehen. Dort bindet das NFX und stabilisiert den down- Zustand. Dies impliziert, dass die down- Struktur einen nicht leitenden Kanalzustand darstellt, der durch eine Bindung des Norfluoxetins stabilisiert wird. Eine Bindung im konduktiven up- Zustand scheint nicht möglich, da in diesem Zustand die Seitenfenestrierungen und somit die Bindungsstelle für NFX nicht existieren (Dong et al., 2015).

4.3 Wirkmechanismus von BL- 1249

Meine Ergebnisse zeigen, dass NFX und BL- 1249 um eine gemeinsame Bindungsstelle im TREK- 2- Kanal kompetieren. Der Wirkmechanismus muss allerdings prinzipiell anders sein, da BL- 1249 aktiviert, während NFX inhibiert. Ein möglicher Mechanismus könnte darin bestehen, dass BL- 1249 den aktiven up- Zustand stabilisiert, wohingegen NFX eine Stabilisierung des wenig aktiven down- Zustands bewirkt. Diese Frage wurde mittlerweile durch strukturelle Daten beantwortet, die ich im Folgenden kurz darstellen möchte.

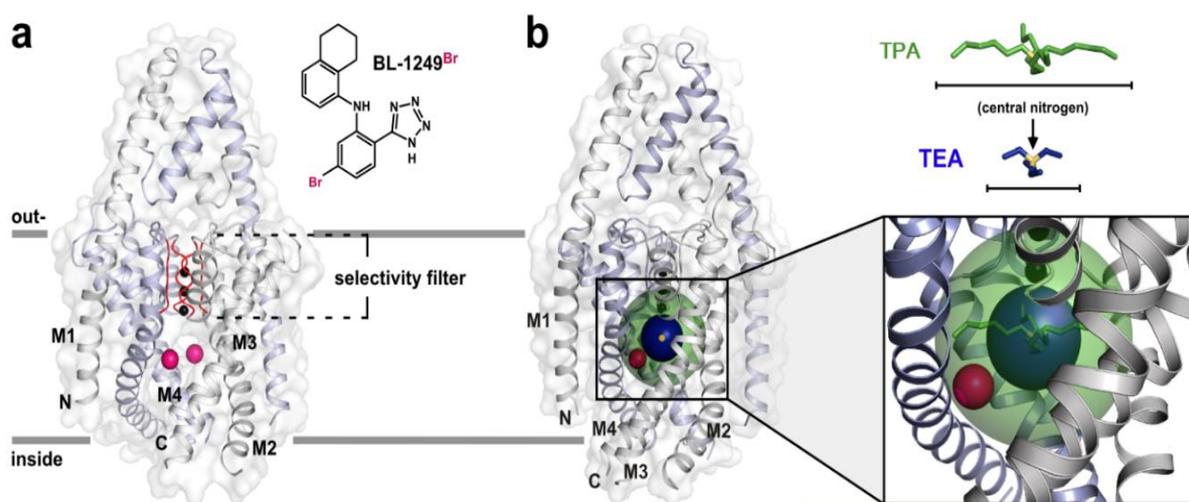


Abb. 21: Darstellung der Position des Bromatoms aus dem bromierten BL- 1249 im TREK- 2- Kanal (down-Zustand) im Vergleich zu TPA und TEA. (a) Die TREK- 2- Struktur zeigt die aus Kokristallisationsexperimenten bekannte Position der Bromatome des bromierten BL- 1249 (pink) im Kanalprotein. Die Kaliumionen im Selektivitätsfilter sind schwarz abgebildet. **(b)** In derselben Kanalstruktur wie in (a) sind die Bromatome des bromierten BL- 1249 in ihrer Position relativ zu den Bindungsstellen von TPA (grün) und TEA (blau) und deren sphärischer Repräsentation abgebildet. Bemerkenswert ist, dass sich das Bromatom nur mit der Sphäre von TPA, nicht von TEA überschneidet. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Konkurrenzexperimenten überein. TPA reduziert die BL- 1249- Affinität am TREK- 2- Kanal, TEA dagegen nicht (Schewe et al, 2019). (Abbildung übernommen aus Schewe et al., 2019, Fig. 2)

Im Rahmen einer Kooperation mit der strukturbiologischen Arbeitsgruppe um Professor Liz Carpenter (Oxford University) wurde bromiertes BL- 1249 mit dem TREK- 2- Kanal kokristallisiert (Vgl. Abb. 21).

Diese Arbeiten führten zu einer Röntgenstruktur des Kanals mit relativ niedriger Auflösung. Die Struktur erlaubte es nicht, die Elektronendichte des BL- 1249- Moleküls direkt zu bestimmen, aber die Elektronendichte des Bromatoms konnte eindeutig lokalisiert werden. Interessanterweise entspricht die Kristallstruktur mit BL- 1249 der down- Zustand- Struktur des TREK- 2- Kanals. Dies impliziert, dass BL- 1249 nicht durch Stabilisierung des konduktiven up- Zustands zur Aktivierung führt. Viel mehr ist anzunehmen, dass BL- 1249 an den down- Zustand des Kanals bindet und diesen aktiviert. In der Abbildung 21 ist die Lokalisation der Bromatomdichte dargestellt, welche sich in direkter räumlicher Nähe zu dem Leucin 304 (entspricht in der Abbildung 22 dem L320) befindet. Dies weist daraufhin, dass L304 mit hoher Wahrscheinlichkeit direkt mit dem BL- 1249- Molekül interagiert, was meine funktionellen Daten aus den Kompetitions- und Mutageneseexperimenten ebenfalls nahelegen. Um die Orientierung des BL- 1249- Moleküls im Kanalprotein zu ermitteln, wurden in einer weiteren Kooperation mit Dr. Han Sun am FMP in Berlin MD (molecular dynamics)- Simulationen durchgeführt (Vgl. Abb. 22). Diese Simulationen ergaben Einblicke in den wahrscheinlichen Wirkmechanismus des BL- 1249.

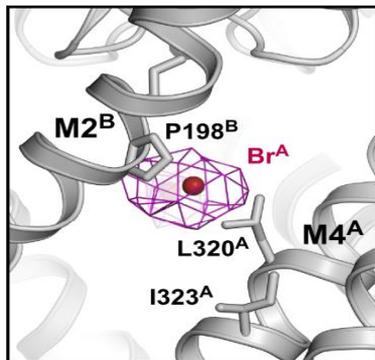


Abb. 22: Molecular dynamics- Simulationen zur Darstellung der Orientierung des Bromatoms des bromierten BL- 1249- Moleküls im TREK- 2- Kanal. Das Bromatom ist in rot in seiner Ausrichtung dargestellt. Der in dieser Abbildung mit L320 beschriftete Rest entspricht dem von mir untersuchten Leucin 304. Die transmembranären Helices TM2 und TM4 sind in grau dargestellt. (Abbildung übernommen aus Schewe et al., 2019, Fig. 2)

Das BL- 1249- Molekül besitzt einen Tetrazolring, der im physiologischen pH- Bereich deprotoniert und daher negativ geladen vorliegt. Die MD- Simulationen zeigen, dass dieser Tetrazolring in die Porenkavität unterhalb des Selektivitätsfilters projiziert und elektrostatisch die Konzentration von Kaliumionen in der Kavität erhöht. Diese Konzentrationserhöhung steht wahrscheinlich in direktem kausalen Bezug zur Aktivierung des Selektivitätsfilters. Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe um Prof. Thomas Baukrowitz (Physiologisches Institut der CAU, Kiel) zeigten, dass der Ionenbesatz des Selektivitätsfilters maßgeblich für die Offenwahrscheinlichkeit des Selektivitätsfiltergates ist. Wie in der Einleitung beschrieben (s.

Ion Flux- Gating) bewirkt ein erhöhter Ionenbesatz des Selektivitätsfilters eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Das Konzept impliziert einen für die BL- 1249- Aktivierung ebenfalls naheliegenden Mechanismus. Die Zunahme der Kaliumionenkonzentration in der Kavität durch BL- 1249 könnte zu einem erhöhten Besatz des Selektivitätsfilters mit Kaliumionen führen und diesen dadurch aktivieren. In der Tat konnte in MD- Simulationen gezeigt werden, dass BL- 1249 zu einer erhöhten Kaliumbindung im Selektivitätsfilter führt.

Dieses Konzept stellt ein neuartiges pharmakologisches Wirkprinzip dar, bei dem ein Molekül durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den permeierenden Ionen zu einer Kanalaktivierung führt. Interessanterweise wurden in der Arbeitsgruppe um Prof. Thomas Baukowitz (Physiologisches Institut der CAU, Kiel) eine Reihe niedermolekularer weiterer negativ geladener Kanalaktivatoren identifiziert, die ebenfalls K_{2P} - Kanäle wie die TREK-/ TRAAK- Subfamilie und TALK, aber auch andere Kaliumkanäle wie hERG und BK- Kanäle aktivieren. Die durch BL- 1249- aktivierten Kanäle haben gemeinsam, dass sie am Selektivitätsfilter geschaltet werden. Dies impliziert, dass möglicherweise all diese Kanäle durch den oben beschriebenen elektrostatischen Mechanismus aktiviert werden.

5. Schlusswort

Da das Molekül BL- 1249 auf alle bisher untersuchten K_{2P} - Kanäle eine Wirkung zeigt, ist es nicht als selektiver Kanalaktivator im menschlichen Organismus zu nutzen. Die Polypharmakologie des BL- 1249 ist zum einen nachteilig, aber in bestimmten neurologischen Akutsituationen, wie bei einem ischämischen Schlaganfall oder Status epilepticus möglicherweise von Vorteil. Einer Vielzahl der durch BL- 1249 aktivierten Kaliumkanäle wird eine neuroprotektive Funktion zugeschrieben (z. B. TREK- 1, TREK- 2, TRAAK, THIK- 1 und BK- Kanälen). Des Weiteren konnte ich in meiner Arbeit erstmals überhaupt einen potenten Aktivator für die Kanäle TALK- 2 und THIK- 1 identifizieren. Dies sollte eine bessere Untersuchung der Kanäle in nativen Präparationen ermöglichen. Mit der Identifizierung der Bindungsstelle von BL- 1249 im TREK- 1- Kanal ebnete meine Arbeit den Weg zur Identifizierung ähnlicher Bindungsstellen in verschiedenen K_{2P} - Kanälen und weiteren Kaliumkanälen (BK- und hERG- Kanäle) und bildete einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung des Wirkmechanismus von BL- 1249 (Schewe et al, 2019).

6. Zusammenfassung

Zwei- Porendomänen- Kaliumkanäle (K_{2P} - Kanäle) sind die zuletzt entdeckte und am wenigsten erforschte Familie der Kaliumkanäle. Die Familie der K_{2P} -Kanäle umfasst beim Menschen fünfzehn Mitglieder, welche nach Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenzen in sechs Subfamilien unterteilt werden. Der Name der Kanäle leitet sich aus ihrer Struktur ab, da sie pro Untereinheit zwei porenbildende Domänen und vier Transmembrandomänen besitzen. Funktionelle K_{2P} -Kanäle assemblieren als Dimere, bei denen die insgesamt vier Porendomänen eine kaliumselektive Pore bilden.

K_{2P} - Kanäle sind im Menschen ubiquitär mit verschiedenen gewebespezifischen Mustern exprimiert und an diversen (patho-) physiologischen Prozessen beteiligt. Dazu gehören beispielsweise die Regulation der neuronalen Erregbarkeit, der zellulären Signaltransduktion, der Zellproliferation und die Beteiligung an diversen metabolischen Prozessen. K_{2P} -Kanäle scheinen eine Rolle bei der Entstehung einer Reihe von Erkrankungen zu spielen, zu denen Depressionen, kardiale Arrhythmien, Hypertension und verschiedene endokrine Erkrankungen gehören. Daher stellen diese Kanäle potentielle Zielstrukturen für neue Pharmaka dar. Die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle wird durch eine große Bandbreite verschiedener Stimuli, wie Temperatur, Spannung, mechanischer Stress, pH- Wert und endogene Signalmoleküle, genauso wie durch synthetisierte Substanzen beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst verschiedene bekannte K_{2P} - Kanalaktivatoren hinsichtlich ihrer Wirkung und Potenz auf K_{2P} - Kanäle charakterisiert. Die untersuchten Substanzen sind 2- Aminoethoxydiphenylborat, Riluzol, Diphenylboranyloxy- (diphenyl) boran, 3-(3,6-Dichloro-carbazol-9-yl)-propan-1,2-diol, Drofenin und das als BL- 1249 bezeichnete (5,6,7,8-Tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl]-amin. Anschließend wurden die Experimente auf die Aufklärung des Wirkmechanismus des hochaffin auf alle untersuchten Kanälen wirkende BL- 1249 konzentriert. Die Experimente wurden mit der Patch Clamp- Technik durchgeführt. Es wurden große inside- out-Membranpatche aus *Xenopus laevis*- Oozyten hergestellt, welchen einige Tage zuvor manuell die kanalspezifische mRNA injiziert wurde.

Die unterschiedlichen Kanäle zeigten eine Subfamilien- spezifische reversible Aktivierung oder Inhibition bei Applikation der Chemikalien. Am ausführlichsten wurde in dieser Arbeit die Wirkung des Pharmakons BL- 1249 untersucht.

Zudem wurde mit der Aufklärung der Bindungsstelle und des Wirkmechanismus von BL- 1249 am TREK- 1- Kanal begonnen; dieser Kanal wird von BL- 1249 sehr potent aktiviert. In K_{2P} -Kanälen ist der Selektivitätsfilter die einzige ins Schaltverhalten involvierte Struktur. Das sogenannte „helix- bundle- crossing“ am intrazellulären Poreneingang beeinflusst die Kaliumleitfähigkeit dagegen nicht. Es wurden neben Konkurrenzexperimenten mit etablierten Kanalblockern einzelne Aminosäuren im Kanalprotein mutiert, um zu klären, ob der mutierte Aminosäurerest eine kritische molekulare Determinante für die Bindung oder den Signaltransfer zum Selektivitätsfilter darstellt. Die Ergebnisse lassen eine Lokalisation der BL- 1249- Bindungsstelle dicht unterhalb des Selektivitätsfilters annehmen.

Experimente aus Kooperationen wie Computersimulationen zur molekularen Dynamik, Kristallstrukturen und weiterführende Patch- Clamp- Experimente brachten im Verlauf weitere Erkenntnisse zum Wirkmechanismus von BL- 1249 im Speziellen und allgemein zur Erforschung des Wirkmechanismus von niedermolekularen Substanzen an K_{2P} - Kanälen.

Summary

The two- pore- domain potassium channels (K_{2P}) are the less well known and studied family of potassium channels. 15 channels are divided into six subfamilies by similarities of their amino acid- sequences. They are characterized by their subunit- structure that possesses two pore-forming domains and four transmembrane segments. K_{2P} - channels are ubiquitous expressed with tissues- specific patterns and are implicated in many (patho-) physiological processes such as the regulation of the cell excitability, signal transduction, cell proliferation and in diverse metabolic regulations. These channels are implicated to play an important role in many diseases, like depression, cardiac arrhythmia, hypertension and different endocrine diseases. Therefore, K_{2P} - channels represent potential targets for the development of new drugs. A diverse range of stimuli such as temperature, voltage, mechanical stress, pH and endogenous signal molecules as well as pharmaceutical drugs regulates the open probability of K_{2P} - channels.

For this thesis we tested several activators of K_{2P} - channels for their potency to regulate various K_{2P} - channels. The used drugs are 2- aminoethoxydiphenylborate, riluzole, diphenylboranyloxy- (diphenyl)borane, 3-(3,6-Dichloro-carbazole-9-yl)-propane-1,2-diol, drofenine and (5,6,7,8-Tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazole-5-yl)-phenyl]-amine, that is referred to as BL- 1249. Following, the experiments were focused on to the

investigation of the mechanisms of action of the highly potent BL- 1249. The experiments on the K_{2P} - members were done with the patch- clamp- technique; giant inside- out- membrane patches were used from *Xenopus laevis*- oocytes.

The different K_{2P} - channels displayed a subfamily- depending reversible activation or inhibition while drug application. BL- 1249 has been the drug tested in detail at every subfamily. Furthermore, we tried to figure out the binding- site of BL- 1249 in TREK- 1; the channel is potent activated by BL- 1249. In K_{2P} - channels the selectivity filter is the only structure that is known as responsible for the gating of K_{2P} - channels whereas the helix- bundle- crossing at the intracellular pore entrance does not influence the potassium conductance. We have mutated single amino acids to clarify which amino acid- residues are necessary for BL- 1249- binding and for transferring the signal to the selectivity filter. Our results suggest a localization of the binding site inside the channel pore close under the selectivity filter.

For the identification of the binding site we have used the mutagenesis scan as well as completion experiments with drugs with proofed binding sites.

Further experiments in cooperations like computer simulations of molecular dynamics, crystal structures and more patch clamp- experiments have lead to more proofs for the mechanism of action of BL- 1249 in K_{2P} - channels in particular and small molecule- drugs in general.

7. Literaturverzeichnis

- <[HTTP://WWW.NOBELPRIZE.ORG/NOBEL_PRIZES/MEDICINE/LAUREATES/1991/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1991/)>. "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1991" Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Web. 21 Sep 2015. [Online].
- ALLOUI, A., ZIMMERMANN, K., MAMET, J., DUPRAT, F., NOEL, J., CHEMIN, J., GUY, N., BLONDEAU, N., VOILLEY, N., RUBAT-COUDERT, C., BORSOTTO, M., ROMÉY, G., HEURTEAUX, C., REEH, P., ESCHALIER, A. & LAZDUNSKI, M. 2006. TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J*, 25, 2368-76.
- ARMSTRONG, C. M. 1966. Time course of TEA(+)-induced anomalous rectification in squid giant axons. *J Gen Physiol*, 50, 491-503.
- ARMSTRONG, C. M. & BEZANILLA, F. 1977. Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol*, 70, 567-90.
- BAGRIANTSEV, S. N., ANG, K. H., GALLARDO-GODOY, A., CLARK, K. A., ARKIN, M. R., RENSLO, A. R. & MINOR, D. L., JR. 2013. A high-throughput functional screen identifies small molecule regulators of temperature- and mechano-sensitive K₂P channels. *ACS Chem Biol*, 8, 1841-51.
- BAGRIANTSEV, S. N., CLARK, K. A. & MINOR, D. L., JR. 2012. Metabolic and thermal stimuli control K₂(P)_{2.1} (TREK-1) through modular sensory and gating domains. *EMBO J*, 31, 3297-308.
- BAGRIANTSEV, S. N., PEYRONNET, R., CLARK, K. A., HONORE, E. & MINOR, D. L., JR. 2011. Multiple modalities converge on a common gate to control K₂P channel function. *EMBO J*, 30, 3594-606.
- BAUKROWITZ, T. & YELLEN, G. 1996. Use-dependent blockers and exit rate of the last ion from the multi-ion pore of a K⁺ channel. *Science*, 271, 653-6.
- BAYLISS, D. A. & BARRETT, P. Q. 2008. Emerging roles for two-pore-domain potassium channels and their potential therapeutic impact. *Trends Pharmacol Sci*, 29, 566-75.
- BELTRAN, L., BELTRAN, M., AGUADO, A., GISSELMANN, G. & HATT, H. 2013. 2-Aminoethoxydiphenyl borate activates the mechanically gated human KCNK channels KCNK 2 (TREK-1), KCNK 4 (TRAAK), and KCNK 10 (TREK-2). *Front Pharmacol*, 4, 63.
- BERG, A. P., TALLEY, E. M., MANGER, J. P. & BAYLISS, D. A. 2004. Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K⁺ (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits. *J Neurosci*, 24, 6693-702.
- BICHET, D., BLIN, S., FELICIANGELI, S., CHATELAIN, F. C., BOBAK, N. & LESAGE, F. 2015. Silent but not dumb: how cellular trafficking and pore gating modulate expression of TWIK1 and THIK2. *Pflugers Arch*, 467, 1121-31.
- BITTNER, S., RUCK, T., FERNANDEZ-ORTH, J. & MEUTH, S. G. 2014. TREK-king the blood-brain-barrier. *J Neuroimmune Pharmacol*, 9, 293-301.
- BITTNER, S., RUCK, T., SCHUHMANN, M. K., HERRMANN, A. M., MOHA OU MAATI, H., BOBAK, N., GOBEL, K., LANGHAUSER, F., STEGNER, D., EHLING, P., BORSOTTO, M., PAPE, H. C., NIESWANDT, B., KLEINSCHNITZ, C., HEURTEAUX, C., GALLA, H. J., BUDDE, T., WIENDL, H. & MEUTH, S. G. 2013. Endothelial TWIK-related potassium channel-1 (TREK1) regulates immune-cell trafficking into the CNS. *Nat Med*, 19, 1161-5.
- BORSOTTO, M., VEYSSIERE, J., MOHA OU MAATI, H., DEVADER, C., MAZELLA, J. & HEURTEAUX, C. 2015. Targeting two-pore domain K(+) channels TREK-1 and TASK-3 for the treatment of depression: a new therapeutic concept. *Br J Pharmacol*, 172, 771-84.
- BROHAWN, S. G., DEL MARMOL, J. & MACKINNON, R. 2012. Crystal structure of the human K₂P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K⁺ ion channel. *Science*, 335, 436-41.
- CATTERALL, W. A. 1992. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol Rev*, 72, S15-48.
- CHA, A., SNYDER, G. E., SELVIN, P. R. & BEZANILLA, F. 1999. Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature*, 402, 809-13.
- CHEMIN, J., PATEL, A. J., DUPRAT, F., LAURITZEN, I., LAZDUNSKI, M. & HONORE, E. 2005. A phospholipid sensor controls mechanogating of the K⁺ channel TREK-1. *EMBO J*, 24, 44-53.

- CHEN, W. C. & DAVIS, R. L. 2006. Voltage-gated and two-pore-domain potassium channels in murine spiral ganglion neurons. *Hear Res*, 222, 89-99.
- CHOE, S. 2002. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci*, 3, 115-21.
- CHUNG, M. K., GULER, A. D. & CATERINA, M. J. 2005. Biphasic currents evoked by chemical or thermal activation of the heat-gated ion channel, TRPV3. *J Biol Chem*, 280, 15928-41.
- CID, L. P., ROA-ROJAS, H. A., NIEMEYER, M. I., GONZALEZ, W., ARAKI, M., ARAKI, K. & SEPULVEDA, F. V. 2013. TASK-2: a K2P K(+) channel with complex regulation and diverse physiological functions. *Front Physiol*, 4, 198.
- COBB, M. 2002. Timeline: exorcizing the animal spirits: Jan Swammerdam on nerve function. *Nat Rev Neurosci*, 3, 395-400.
- COLE, K. S. 1979. Mostly membranes (Kenneth S. Cole). *Annu Rev Physiol*, 41, 1-24.
- CZIRJAK, G. & ENYEDI, P. 2006a. Targeting of calcineurin to an NFAT-like docking site is required for the calcium-dependent activation of the background K⁺ channel, TRESK. *J Biol Chem*, 281, 14677-82.
- CZIRJAK, G. & ENYEDI, P. 2006b. Zinc and mercuric ions distinguish TRESK from the other two-pore-domain K⁺ channels. *Mol Pharmacol*, 69, 1024-32.
- CZIRJAK, G., FISCHER, T., SPAT, A., LESAGE, F. & 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, 863-74.
- DANTHI, S., ENYEART, J. A. & ENYEART, J. J. 2004. Caffeic acid esters activate TREK-1 potassium channels and inhibit depolarization-dependent secretion. *Mol Pharmacol*, 65, 599-610.
- DAVIES, L. A., HU, C., GUAGLIARDO, N. A., SEN, N., CHEN, X., TALLEY, E. M., CAREY, R. M., BAYLISS, D. A. & BARRETT, P. Q. 2008. TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 2203-8.
- DAVIS, K. A. 2010. *Ion Channels from structure to function*, Oxford, Oxford, University Press.
- DECHER, N., KIPER, A. K., ROLFES, C., SCHULZE-BAHR, E. & RINNE, S. 2015. The role of acid-sensitive two-pore domain potassium channels in cardiac electrophysiology: focus on arrhythmias. *Pflugers Arch*, 467, 1055-67.
- DEERING-RICE, C. E., MITCHELL, V. K., ROMERO, E. G., ABDEL AZIZ, M. H., RYSKAMP, D. A., KRIZAJ, D., GOPAL, V. R. & REILLY, C. A. 2014. Drofenine: A 2-APB Analogue with Greater Selectivity for Human TRPV3. *Pharmacol Res Perspect*, 2, e00062.
- DONG, Y. Y., PIKE, A. C., MACKENZIE, A., MCCLENAGHAN, C., ARYAL, P., DONG, L., QUIGLEY, A., GRIEBEN, M., GOUBIN, S., MUKHOPADHYAY, S., RUDA, G. F., CLAUSEN, M. V., CAO, L., BRENNAN, P. E., BURGESS-BROWN, N. A., SANSOM, M. S., TUCKER, S. J. & CARPENTER, E. P. 2015. K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science*, 347, 1256-9.
- DOYLE, D. A., MORAIS CABRAL, J., PFUETZNER, R. A., KUO, A., GULBIS, J. M., COHEN, S. L., CHAIT, B. T. & MACKINNON, R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 280, 69-77.
- DUMONT, J. N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology*, 136, 153-179.
- DUMONT, J. N. & BRUMMETT, A. R. 1978. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues. *J Morphol*, 155, 73-97.
- DUPRAT, F., GIRARD, C., JARRETOU, G. & LAZDUNSKI, M. 2005. Pancreatic two P domain K⁺ channels TALK-1 and TALK-2 are activated by nitric oxide and reactive oxygen species. *J Physiol*, 562, 235-44.
- DUPRAT, F., LESAGE, F., PATEL, A. J., FINK, M., ROMEY, G. & LAZDUNSKI, M. 2000. The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *Mol Pharmacol*, 57, 906-12.
- ELLINGHAUS, P., SCHEUBEL, R. J., DOBREV, D., RAVENS, U., HOLTZ, J., HUETTER, J., NIELSCH, U. & MORAWIETZ, H. 2005. Comparing the global mRNA expression profile of human atrial and ventricular myocardium with high-density oligonucleotide arrays. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 129, 1383-90.

- ENYEDI, P. & CZIRJAK, G. 2010. Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev*, 90, 559-605.
- FELICIANGELI, S., CHATELAIN, F. C., BICHET, D. & LESAGE, F. 2015. The family of K2P channels: salient structural and functional properties. *J Physiol*, 593, 2587-603.
- FICKER, E., TAGLIALATELA, M., WIBLE, B. A., HENLEY, C. M. & BROWN, A. M. 1994. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science*, 266, 1068-72.
- FINK, M., DUPRAT, F., LESAGE, F., REYES, R., ROMÉY, G., HEURTEAUX, C. & LAZDUNSKI, M. 1996. Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J*, 15, 6854-62.
- FINK, M., LESAGE, F., DUPRAT, F., HEURTEAUX, C., REYES, R., FOSSET, M. & LAZDUNSKI, M. 1998. A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J*, 17, 3297-308.
- FOO, B., WILLIAMSON, B., YOUNG, J. C., LLUKACS, G., & SHRIER, A. (2016). hERG quality control and the long QT syndrome. *The Journal of physiology*, 594(9), 2469-81.
- FRIEDRICH, C., RINNE, S., ZUMHAGEN, S., KIPER, A. K., SILBERNAGEL, N., NETTER, M. F., STALLMEYER, B., SCHULZE-BAHR, E. & DECHER, N. 2014. Gain-of-function mutation in TASK-4 channels and severe cardiac conduction disorder. *EMBO Mol Med*, 6, 937-51.
- GIRARD, C., DUPRAT, F., TERRENOIRE, C., TINEL, N., FOSSET, M., ROMÉY, G., LAZDUNSKI, M. & LESAGE, F. 2001. Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K(+) channels. *Biochem Biophys Res Commun*, 282, 249-56.
- GOLDSTEIN, S. A., BOCKENHAUER, D., O'KELLY, I. & ZILBERBERG, N. 2001. Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci*, 2, 175-84.
- GRAY, A. T., ZHAO, B. B., KINDLER, C. H., WINEGAR, B. D., MAZUREK, M. J., XU, J., CHAVEZ, R. A., FORSAYETH, J. R. & YOST, C. S. 2000. Volatile anesthetics activate the human tandem pore domain baseline K⁺ channel KCNK5. *Anesthesiology*, 92, 1722-30.
- GUNDERSEN, C. B., MILEDI, R. & PARKER, I. 1984. Slowly inactivating potassium channels induced in *Xenopus* oocytes by messenger ribonucleic acid from Torpedo brain. *J Physiol*, 353, 231-48.
- GUTMAN, G. A., CHANDY, K. G., GRISSMER, S., LAZDUNSKI, M., MCKINNON, D., PARDO, L. A., ROBERTSON, G. A., RUDY, B., SANGUINETTI, M. C., STUHMER, W. & WANG, X. 2005. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 473-508.
- HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. & SIGWORTH, F. J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 391, 85-100.
- 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., BENDAHOU, S., GOMEZ-SANCHEZ, C. E., ALLER, M. I., WISDEN, W., WEBER, A., LESAGE, F., WARTH, R. & BARHANIN, J. 2008. Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. *EMBO J*, 27, 179-87.
- HELMHOLTZ, H. V. 1850. *Note sur la vitesse de propagation de l'agent nerveux dans les nerfs rachidiens. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des science* 30: 204-208
- HEURTEAUX, C., GUY, N., LAIGLE, C., BLONDEAU, N., DUPRAT, F., MAZZUCA, M., LANG-LAZDUNSKI, L., WIDMANN, C., ZANZOURI, M., ROMÉY, G. & LAZDUNSKI, M. 2004. TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J*, 23, 2684-95.
- HILLE, B. 2001. *Ion channels and excitable membranes* Sunderland, Massachusetts U.S.A., Sinauer Associates.
- HONORE, E. 2007. The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci*, 8, 251-61.
- HU, H. Z., GU, Q., WANG, C., COLTON, C. K., TANG, J., KINOSHITA-KAWADA, M., LEE, L. Y., WOOD, J. D. & ZHU, M. X. 2004. 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem*, 279, 35741-8.

- INNAMAA, A., JACKSON, L., ASHER, V., VAN SHALKWYK, G., WARREN, A., HAY, D., BALI, A., SOWTER, H. & KHAN, R. 2013. Expression and prognostic significance of the oncogenic K2P potassium channel KCNK9 (TASK-3) in ovarian carcinoma. *Anticancer Res*, 33, 1401-8.
- KANG, D., CHOE, C. & KIM, D. 2005. Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *J Physiol*, 564, 103-16.
- KANG, D., HAN, J., TALLEY, E. M., BAYLISS, D. A. & KIM, D. 2004. Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells. *J Physiol*, 554, 64-77.
- KANG, D. & KIM, D. 2004. Single-channel properties and pH sensitivity of two-pore domain K⁺ channels of the TALK family. *Biochem Biophys Res Commun*, 315, 836-44.
- KENNARD, L. E., CHUMBLEY, J. R., RANATUNGA, K. M., ARMSTRONG, S. J., VEALE, E. L. & MATHIE, A. 2005. Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Br J Pharmacol*, 144, 821-9.
- KESHAVAPRASAD, B., LIU, C., AU, J. D., KINDLER, C. H., COTTEN, J. F. & YOST, C. S. 2005. Species-specific differences in response to anesthetics and other modulators by the K2P channel TRESK. *Anesth Analg*, 101, 1042-9, table of contents.
- KIM, C. W., CHOE, C., KIM, E. J., LEE, J. I., YOON, S. Y., CHO, Y. W., HAN, S., TAK, H. M., HAN, J. & KANG, D. 2012. Dual effects of fluoxetine on mouse early embryonic development. *Toxicol Appl Pharmacol*, 265, 61-72.
- KIM, D., SLADEK, C. D., AGUADO-VELASCO, C. & MATHIASSEN, J. R. 1995. Arachidonic acid activation of a new family of K⁺ channels in cultured rat neuronal cells. *J Physiol*, 484 (Pt 3), 643-60.
- KINDLER, C. H., PAUL, M., ZOU, H., LIU, C., WINEGAR, B. D., GRAY, A. T. & YOST, C. S. 2003. Amide local anesthetics potently inhibit the human tandem pore domain background K⁺ channel TASK-2 (KCNK5). *J Pharmacol Exp Ther*, 306, 84-92.
- KINDLER, C. H., YOST, C. S. & GRAY, A. T. 1999. Local anesthetic inhibition of baseline potassium channels with two pore domains in tandem. *Anesthesiology*, 90, 1092-102.
- KUANG, Q., PURHONEN, P. & HEBERT, H. 2015. Structure of potassium channels. *Cell Mol Life Sci*, 72, 3677-93.
- LENZINI, L., CAROCCIA, B., CAMPOS, A. G., FASSINA, A., BELLONI, A. S., SECCIA, T. M., KUPPUSAMY, M., FERRARO, S., SKANDER, G., BADER, M., RAINEY, W. E. & ROSSI, G. P. 2014. Lower expression of the TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel 2 (TASK-2) gene is a hallmark of aldosterone-producing adenoma causing human primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*, 99, E674-82.
- LESAGE, F., GUILLEMARE, E., FINK, M., DUPRAT, F., LAZDUNSKI, M., ROMEY, G. & BARHANIN, J. 1996a. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J*, 15, 1004-11.
- LESAGE, F., REYES, R., FINK, M., DUPRAT, F., GUILLEMARE, E. & LAZDUNSKI, M. 1996b. Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO J*, 15, 6400-7.
- LIANG, B., SOKA, M., CHRISTENSEN, A. H., OLESEN, M. S., LARSEN, A. P., KNOP, F. K., WANG, F., NIELSEN, J. B., ANDERSEN, M. N., HUMPHREYS, D., MANN, S. A., HUTTNER, I. G., VANDENBERG, J. I., SVENDSEN, J. H., HAUNSO, S., PREISS, T., SEEBOHM, G., OLESEN, S. P., SCHMITT, N. & FATKIN, D. 2014. Genetic variation in the two-pore domain potassium channel, TASK-1, may contribute to an atrial substrate for arrhythmogenesis. *J Mol Cell Cardiol*, 67, 69-76.
- LINDEN, A. M., ALLER, M. I., LEPPA, E., VEKOVISCHEVA, O., AITTA-AHO, T., VEALE, E. L., MATHIE, A., ROSENBERG, P., WISDEN, W. & KORPI, E. R. 2006. The in vivo contributions of TASK-1-containing channels to the actions of inhalation anesthetics, the alpha(2) adrenergic sedative dexmedetomidine, and cannabinoid agonists. *J Pharmacol Exp Ther*, 317, 615-26.
- LINDEN, A. M., SANDU, C., ALLER, M. I., VEKOVISCHEVA, O. Y., ROSENBERG, P. H., WISDEN, W. & KORPI, E. R. 2007. TASK-3 knockout mice exhibit exaggerated nocturnal activity, impairments in cognitive functions, and reduced sensitivity to inhalation anesthetics. *J Pharmacol Exp Ther*, 323, 924-34.
- LOLICATO, M., RIEGELHAUPT, P. M., ARRIGONI, C., CLARK, K. A. & MINOR, D. L., JR. 2014. Transmembrane helix straightening and buckling underlies activation of mechanosensitive and thermosensitive K(2P) channels. *Neuron*, 84, 1198-212.

- LOTSHAW, D. P. 2007. Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K⁺ channels. *Cell Biochem Biophys*, 47, 209-56.
- MA, L., ZHANG, X. & CHEN, H. 2011. TWIK-1 two-pore domain potassium channels change ion selectivity and conduct inward leak sodium currents in hypokalemia. *Sci Signal*, 4, ra37.
- MAINGRET, F., FOSSET, M., LESAGE, F., LAZDUNSKI, M. & HONORE, E. 1999. TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K⁺ channel. *J Biol Chem*, 274, 1381-7.
- MAINGRET, F., PATEL, A. J., LESAGE, F., LAZDUNSKI, M. & HONORE, E. 2000. Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K⁽⁺⁾ channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem*, 275, 10128-33.
- MALJEVIC, S. & LERCHE, H. 2013. Potassium channels: a review of broadening therapeutic possibilities for neurological diseases. *J Neurol*, 260, 2201-11.
- MARUYAMA, T., KANAJI, T., NAKADE, S., KANNO, T. & MIKOSHIBA, K. 1997. 2APB, 2-Aminoethoxydiphenyl Borate, a Membrane-Penetrable Modulator of Ins(1,4,5)P₃-Induced Ca²⁺ Release. *Journal of Biochemistry*, 122, 498-505.
- MATSUDA, H., SAIGUSA, A. & IRISAWA, H. 1987. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg²⁺. *Nature*, 325, 156-9.
- METHFESSEL, C., WITZEMANN, V., TAKAHASHI, T., MISHINA, M., NUMA, S. & SAKMANN, B. 1986. Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflugers Arch*, 407, 577-88.
- MILEDI, R. & PARKER, I. 1984. Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. *J Physiol*, 357, 173-83.
- MOAR, V. A., GURDON, J. B., LANE, C. D. & MARBAIX, G. 1971. Translational capacity of living frog eggs and oocytes, as judged by messenger RNA injection. *J Mol Biol*, 61, 93-103.
- MOHA OU MAATI, H., VEYSSIERE, J., LABBAL, F., COPPOLA, T., GANDIN, C., WIDMANN, C., MAZELLA, J., HEURTEAUX, C. & BORSOTTO, M. 2012. Spadin as a new antidepressant: absence of TREK-1-related side effects. *Neuropharmacology*, 62, 278-88.
- NEHER, E. & SAKMANN, B. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260, 799-802.
- NOEL, J., SANDOZ, G. & LESAGE, F. 2011. Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels (Austin)*, 5, 402-9.
- NOEL, J., ZIMMERMANN, K., BUSSEROLLES, J., DEVAL, E., ALLOUI, A., DIOCHOT, S., GUY, N., BORSOTTO, M., REEH, P., ESCHALIER, A. & LAZDUNSKI, M. 2009. The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J*, 28, 1308-18.
- OLSCHEWSKI, A., LI, Y., TANG, B., HANZE, J., EUL, B., BOHLE, R. M., WILHELM, J., MORTY, R. E., BRAU, M. E., WEIR, E. K., KWAPISZEWSKA, G., KLEPETKO, W., SEEGER, W. & OLSCHESKI, H. 2006. Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res*, 98, 1072-80.
- PATEL, A. J., HONORE, E., LESAGE, F., FINK, M., ROMNEY, G. & LAZDUNSKI, M. 1999. Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat Neurosci*, 2, 422-6.
- PEREIRA, V., BUSSEROLLES, J., CHRISTIN, M., DEVILLIERS, M., POUPON, L., LEGHA, W., ALLOUI, A., AISSOUNI, Y., BOURINET, E., LESAGE, F., ESCHALIER, A., LAZDUNSKI, M. & NOEL, J. 2014. Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *Pain*, 155, 2534-44.
- PHILLIPS, L. R., ENKVETCHAKUL, D. & NICHOLS, C. G. 2003. Gating dependence of inner pore access in inward rectifier K⁽⁺⁾ channels. *Neuron*, 37, 953-62.
- PIECHOTTA, P. L., RAPEDIUS, M., STANSFELD, P. J., BOLLEPALLI, M. K., EHRLICH, G., ANDRES-ENGUIG, I., FRITZENSCHAFT, H., DECHER, N., SANSOM, M. S., TUCKER, S. J. & BAUKROWITZ, T. 2011. The pore structure and gating mechanism of K₂P channels. *EMBO J*, 30, 3607-19.
- RAGSDALE, D. S., MCPHEE, J. C., SCHEUER, T. & CATTERALL, W. A. 1996. Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9270-5.
- RAJAN, S., WISCHMEYER, E., KARSCHIN, C., PREISIG-MULLER, R., GRZESCHIK, K. H., DAUT, J., KARSCHIN, A. & DERST, C. 2001. THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels. *J Biol Chem*, 276, 7302-11.

- RAPEDIUS, M., FOWLER, P. W., SHANG, L., SANSOM, M. S., TUCKER, S. J. & BAUKROWITZ, T. 2007. H bonding at the helix-bundle crossing controls gating in Kir potassium channels. *Neuron*, 55, 602-14.
- RENIGUNTA, V., SCHLICHTHORL, G. & DAUT, J. 2015. Much more than a leak: structure and function of K(2)p-channels. *Pflugers Arch*, 467, 867-94.
- SALINAS, M., REYES, R., LESAGE, F., FOSSET, M., HEURTEAUX, C., ROMEY, G. & LAZDUNSKI, M. 1999. Cloning of a new mouse two-P domain channel subunit and a human homologue with a unique pore structure. *J Biol Chem*, 274, 11751-60.
- SANDOZ, G. & LEVITZ, J. 2013. Optogenetic techniques for the study of native potassium channels. *Front Mol Neurosci*, 6, 6.
- SCHEWE, M., SUN, H., MERT, Ü., MACKENZIE, A., PIKE, A., SCHULZ, F., CONSTANTIN, C., VOWINKEL, K., CONRAD, L., KIPER, A., GONZALEZ, W., MUSINSZKI, M., TEGTMEIER, M., PRYDE, D., BELABED, H., NAZARE, M., DE GROOT, B., DECHER, N., FAKLER, B., CARPENTER, E., TUCKER, S. & BAUKROWITZ, T. 2019. A pharmacological master key mechanism that unlocks the selectivity filter gate in K⁺ channels. *Science*, 363, 875-880.
- SCHEWE, M., NEMATIAN-ARDESTANI, E., SUN, H., MUSINSZKI, M., CORDEIRO, S., BUCCI, G., DE GROOT, BERT L., TUCKER, STEPHEN J., RAPEDIUS, M. & BAUKROWITZ, T. A Non-canonical Voltage-Sensing Mechanism Controls Gating in K2P K Channels. *Cell*, 164, 937-949.
- SCHULTE, U., WEIDEMANN, S., LUDWIG, J., RUPPERSBERG, J. & FAKLER, B. 2001. K(+)-dependent gating of K(ir)1.1 channels is linked to pH gating through a conformational change in the pore. *J Physiol*, 534, 49-58.
- SEYFARTH, E. A. 2006. Julius Bernstein (1839-1917): pioneer neurobiologist and biophysicist. *Biol Cybern*, 94, 2-8.
- SIMKIN, D., CAVANAUGH, E. J. & KIM, D. 2008. Control of the single channel conductance of K2P10.1 (TREK-2) by the amino-terminus: role of alternative translation initiation. *J Physiol*, 586, 5651-63.
- SINGH, A., SAOTOME, K., MCGOLDRICK, L., SOBOLEVSKY, A.. Structural bases of TRP channel TRPV6 allosteric modulation by 2-APB. *Nat Commun*. 2018 Jun 25;9(1):2465.
- SIR ISAAC NEWTON, M. P. O. N. P., TRANSLATED BY ANDREW MOTTE, REVISED BY FLORIAN CAJORE, GREAT BOOKS OF THE WESTERN WORLD 34, ROBERT MAYNARD HUTCHINS, EDITOR IN CHIEF, WILLIAM BENTON, CHICAGO, 1952:273-74.
- SUN, H., LUO, L., LAL, B., MA, X., CHEN, L., HANN, C. L., FULTON, A. M., LEAHY, D. J., LATERRA, J. & LI, M. 2016. A monoclonal antibody against KCNK9 K(+) channel extracellular domain inhibits tumour growth and metastasis. *Nat Commun*, 7, 10339.
- SWARTZ, K. J. 2004. Opening the gate in potassium channels. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 499-501.
- TERTYSHNIKOVA, S., KNOX, R. J., PLYM, M. J., THALODY, G., GRIFFIN, C., NEELANDS, T., HARDEN, D. G., SIGNOR, L., WEAVER, D., MYERS, R. A. & LODGE, N. J. 2005. BL-1249 [(5,6,7,8-tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl]-amine]: a putative potassium channel opener with bladder-relaxant properties. *J Pharmacol Exp Ther*, 313, 250-9.
- TREPTOW, W. & KLEIN, M. L. 2010. The membrane-bound state of K2P potassium channels. *J Am Chem Soc*, 132, 8145-51.
- VEALE, E. L., AL-MOUBARAK, E., BAJARIA, N., OMOTO, K., CAO, L., TUCKER, S. J., STEVENS, E. B. & MATHIE, A. 2014. Influence of the N terminus on the biophysical properties and pharmacology of TREK1 potassium channels. *Mol Pharmacol*, 85, 671-81.
- VERKHRATSKY, A., KRISHTAL, O. A. & PETERSEN, O. H. 2006. From Galvani to patch clamp: the development of electrophysiology. *Pflugers Arch*, 453, 233-47.
- VIVIER, D., BENNIS, K., LESAGE, F. & DUCKI, S. 2015. Perspectives on the Two-Pore Domain Potassium Channel TREK-1 (TWIK-Related K Channel 1). A Novel Therapeutic Target? *J Med Chem*.
- VOLOSHYNA, I., BESANA, A., CASTILLO, M., MATOS, T., WEINSTEIN, I. B., MANSUKHANI, M., ROBINSON, R. B., CORDON-CARDO, C. & FEINMARK, S. J. 2008. TREK-1 is a novel molecular target in prostate cancer. *Cancer Res*, 68, 1197-203.

- WEI, A. D., GUTMAN, G. A., ALDRICH, R., CHANDY, K. G., GRISSMER, S. & WULFF, H. 2005. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 463-72.
- YELLEN, G. 2002. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419, 35-42.
- ZHUO, R. G., LIU, X. Y., ZHANG, S. Z., WEI, X. L., ZHENG, J. Q., XU, J. P. & MA, X. Y. 2015. Insights into the stimulatory mechanism of 2-aminoethoxydiphenyl borate on TREK-2 potassium channel. *Neuroscience*, 300, 85-93.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ganz besonders meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Baukrowitz dafür danken, dass er mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und mir dadurch die Durchführung der elektrophysiologischen Experimente, auf denen diese Doktorarbeit basiert, ermöglicht hat. Vielen Dank für die herausragende Betreuung in den letzten Jahren und die unermüdliche Bereitschaft mich jederzeit zu unterstützen!

Ein großes Dankeschön für die Einführung ins wissenschaftliche und elektrophysiologische Arbeiten und für die Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen jeglicher Art geht an Dr. Marcus Schewe, Friederike Schultz, Dr. Marianne Musinszki, Dr. Ehsan Nematian und Dr. Sönke Cordeiro. Vielen Dank für eure Unterstützung mit Rat und Tat!

Des Weiteren danke ich Hariolf Fritzenschaft und Michaela Unmack für ihre Unterstützung im molekularbiologischen Bereich, welche mir die Durchführung meiner Experimente sehr erleichtert hat. Dies gilt genauso für die labortechnische Unterstützung durch Ria Neumann.

Das abschließende Dankeschön geht an alle weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Physiologischen Instituts der CAU, Kiel. Es hat mir sehr viel Freude bereitet mit Euch zusammenzuarbeiten!