

**Aus dem Physiologischen Institut
(Direktoren: Prof. Dr. Thomas Baukrowitz,
Prof. Dr. Markus Bleich, Prof. Dr. Peer Wulff)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**Regulation von K₂P-Kanälen durch
Membranspannung, Pharmaka und Membranlipide**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Björn Christian Jürs
aus Bad Oldesloe

Kiel 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Baukrowitz

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Franziska Theilig

Tag der mündlichen Prüfung: 14.09.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 22.07.2022

gez.: Prof. Dr. Thomas Baukrowitz

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

*„Das Glück ist das einzige, das sich verdoppelt,
wenn man es teilt.“*

Albert Schweitzer (1875-1965)

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1 Zellmembran und Ionenkanäle.....	1
1.2 Patch-Clamp-Technik.....	4
1.3 Kaliumkanäle.....	5
1.4 Aufbau von K2P-Kanälen.....	7
1.5 Gating von K2P-Kanälen.....	9
1.6 Regulation von K2P-Kanälen.....	11
1.7 Regulation von Kaliumkanälen durch Membranlipide.....	14
1.8 Physiologie und Pathophysiologie von K2P-Kanälen.....	17
1.9 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2. Material und Methoden.....	22
2.1 RNA-Synthese.....	22
2.2 Mutagenese.....	23
2.3 Oozytenpräparation.....	24
2.4 Injektion von cRNA und Expression.....	24
2.5 Elektrophysiologie.....	25
2.6 Verwendete Lösungen und Chemikalien.....	26
2.7 Datenaufnahme und Datenauswertung.....	27
3. Ergebnisse.....	29
3.1 Regulation von K2P-Kanälen durch pH, Membranspannung und Pharmaka.....	29
3.1.1 Regulation von TALK-2 durch intra- und extrazellulären pH.....	29
3.1.2 Aktivierung von TALK-2 durch Membranspannung und Rb ⁺	32
3.1.3 Aktivierung von TALK-2 durch Pharmaka.....	35
3.1.4 Unterschiede in der TPA ⁺ -Inhibition für verschiedene Aktivierungsmechanismen.....	37

3.2 Regulation von K ₂ P-Kanälen durch Membranlipide.....	39
3.2.1 Regulation von TREK-1 durch Membranlipide.....	39
3.2.2 Regulation von TALK-2 durch Membranlipide.....	41
3.2.3 Regulation weiterer K ₂ P-Kanäle durch LC-CoA und PIP ₂	45
3.2.4 Struktur-Funktionsbeziehungen der Membranlipide.....	50
4. Diskussion.....	55
4.1 Regulation von K ₂ P-Kanälen durch Pharmaka.....	55
4.2 Membranlipid-Regulation von K ₂ P-Kanälen im Vergleich zu K _{iR} -Kanälen.....	60
4.3 Physiologische Relevanz der Regulation von K ₂ P-Kanälen durch LC-CoA.....	66
5. Zusammenfassung.....	70
6. Anhang.....	72
6.1 Literaturverzeichnis.....	72
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	89
6.3 Tabellenverzeichnis.....	91
6.4 Publikationen.....	92
6.5 Eidesstattliche Erklärung.....	93
6.6 Danksagung.....	94

Abkürzungsverzeichnis

2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
CHO	Chinese Hamster Ovary
CoA	Coenzym A
cRNA	Ribonukleinsäure, abgeleitet von einer komplementären Desoxyribonukleinsäure
conc.	Konzentration
C-Terminus	Carboxy-terminales Ende eines Proteins
DAG	Diacylglycerin
DRG	dorsal root ganglia
EC ₅₀	Konzentration mit halbmaximaler Wirkung
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
F	Faraday-Konstante
G _q	heterotrimeres G-Protein, das die Phospholipase C aktiviert
GYG	Glycin-Tyrosin-Glycin
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinylethansulfonsäure
IP ₃	Inositol-3,4,5-triphosphat
K	Kelvin
K ⁺	Kaliumion
K2P	Zwei-Poren-Domänen Kaliumkanal
Kap.	Kapitel
K _{ATP}	ATP-abhängiger einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal (Kir 6.2)
KcsA	Streptomyces lividans Kaliumkanal
K _{ir}	einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal
K _v	spannungsabhängiger Kaliumkanal
LC-CoA	langketiges Acyl-Coenzym A
n	Stichprobengröße
Na ⁺	Natriumion
NO	Stickstoffmonoxid

N-Terminus	Amino-terminales Ende eines Proteins
pH _{ext}	extrazellulärer pH
pH _i	intrazellulärer pH
PI	Phosphatidylinositol
PIP ₂ / PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PolyK	Polylysin
QA	quartäres Ammoniumion
R	Gaskonstante
Rb ⁺	Rubidiumion
S0-S6	Kaliumbindungsstellen in der Pore
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
T	Temperatur
TC	Tissue Culture
TALK	TWIK-related alkaline pH-activated K ⁺ -Kanal
TEA ⁺	Tetraethylammonium
THIK	Halothane-inhibited K ⁺ -Kanal
TM	Transmembransegment
TPA ⁺	Tetrapentylammonium
TREK	TWIK-related K ⁺ -Kanal
TRESK	TWIK-related spinal cord K ⁺ -Kanal
TASK	TWIK-related acid sensing K ⁺ -Kanal
TRAAK	TWIK-related arachidonic acid-stimulated K ⁺ -Kanal
TRPV	Transient receptor potential Kationkanal Subfamilie V
TWIK	Weak inward rectifying K ⁺ -Kanal
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Zellmembran und Ionenkanäle

Jede Zelle unseres Körpers wird von einer Zellmembran umgeben. Diese Plasmamembran, bestehend aus einer Lipiddoppelschicht, grenzt somit den Intra- vom Extrazellulärraum ab. Phospholipide stellen den Großteil der Membranlipide dar und sind gekennzeichnet durch ihre Amphiphilie mit einem apolaren hydrophoben Teil, den Kohlenwasserstoffketten der Fettsäuren, die sich in der Membranmitte gegenüberstehen, und einem polaren hydrophilen Kopfteil, der in den angrenzendes Extrabeziehungsweise Intrazellulärraum hineinragt (Abb. 1.1).

Während Gase und lipidlösliche Substanzen die Zellmembran durch einfache Diffusion passieren können, stellt sie durch ihre Hydrophobizität eine Barriere für Ionen, Wasser und andere hydrophile Substanzen dar. Neben weiteren Bestandteilen enthält die Plasmamembran jedoch auch durch die ganze Membran spannende Proteine, integrale Proteine oder auch Transmembranproteine genannt, welche unter anderem als Transportproteine dienen und Ionenkanäle, Carrierproteine und Pumpen beinhalten. Die Plasmamembran hat also eine wesentliche Bedeutung für die Kommunikation und den Stoffaustausch zwischen Intra- und Extrazellulärraum.

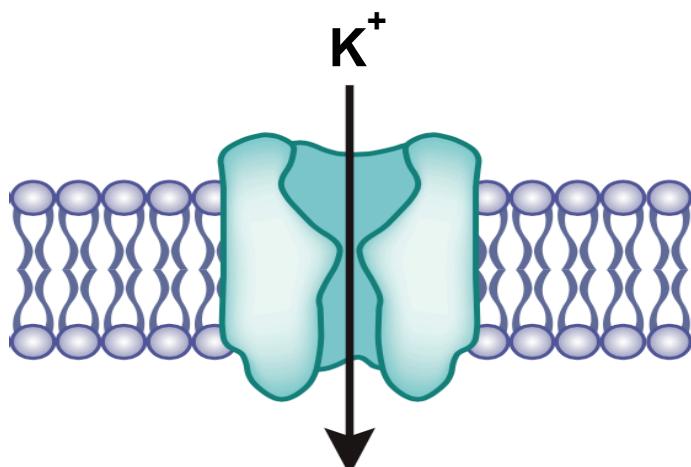


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Plasmamembran mit einem Ionenkanal (modifiziert nach Waxman und Zamponi (2014)). Dargestellt ist die Lipiddoppelschicht, die aus Phospholipiden (blau) aufgebaut ist. Der hydrophile Kopf zeigt nach außen und in die Membranmitte ragen die hydrophoben Fettsäurereste. Als integrales Molekül (grün) ist ein Kaliumionenkanal zu sehen.

Der transmembranäre Transport von Ionen wird durch die Ionenkanäle ermöglicht (Abb. 1.1), die damit für die elektrischen Eigenschaften einer Zelle verantwortlich sind. Sie bestehen aus meist mehreren helikalen Strukturen, die eine Pore umschließen, und werden komplex reguliert. Das ständige Hin- und Herschalten zwischen dem Offen- und Geschlossenzzustand wird als Gating bezeichnet. Der Selektivitätsfilter, der in der Pore gelegen ist, bestimmt die Art der permeierenden Ionen, die entlang des elektrochemischen Gradienten passiv mit einer Rate von über 10^6 Ionen pro Sekunde durch die Kanäle fließen. Diese hohen Raten unterscheiden die Ionenkanäle stark von den anderen Transportformen wie Carrier und Pumpen, die aktiv Ionen über die Membran bewegen (Hille, 2001).

Für den Fluss der Ionen ist eine elektrochemische Triebkraft erforderlich, die sich entsprechend einerseits aus der chemischen Triebkraft, dem transmembranen Konzentrationsgradienten, und andererseits aus der elektrischen Triebkraft, also der transmembranen Potentialdifferenz, was dem Zellmembranpotential entspricht, zusammensetzt (Klinke et al., 2010). Wenn beide Triebkräfte gleich groß, aber entgegengesetzt gerichtet sind, findet kein Nettotransport statt. Das heißt, es gibt für jeden Konzentrationsgradienten eine bestimmte Potentialdifferenz, an dem das elektrochemische Gleichgewicht erfüllt ist. Diese Potentialdifferenz, das Gleichgewichtspotential, wird auch als Nernst-Potenzial bezeichnet.

Zur Berechnung des Gleichgewichtspotentials bedient man sich der Nernst-Gleichung, die sich wiederum aus der Boltzmann-Gleichung herleiten lässt:

$$\frac{c_2}{c_1} = e^{(-\frac{U_2 - U_1}{RT})} \quad \text{chemische Form der Boltzmann-Gleichung}$$

daraus folgt: $U_1 - U_2 = RT \ln \frac{c_2}{c_1}$ (*)

c = Konzentrationen; U = molare freie Enthalpie; R = allgemeine Gaskonstante; T = Temperatur

mit $U_1 - U_2 = z_x F (E_1 - E_2)$ in * ergibt:

$$E_x = E_1 - E_2 = \frac{RT}{z_x F} \ln \frac{[X]_2}{[X]_1} \quad \text{(Nernst-Gleichung (Nernst, 1888))}$$

E_x = Gleichgewichtspotential für Ion X; $E_1 - E_2$ = Membranpotentialdifferenz; F = Faraday-Konstante; z_x = Ladung vom Ion X; $[X]$ = Konzentration vom Ion X

Die Nernst-Gleichung für Kaliumionen lautet somit:

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_o}{[K]_i}$$

Die Subskripte „o“ und „i“ stehen für extra- und intrazellulär (Hille, 2001).

Da in unseren Experimenten die Kaliumionenkonzentrationen sowohl intra- als auch extrazellulär äquimolar waren (jeweils 120 mM KCl), beträgt das Nernst-Potential unter diesen Bedingungen 0 mV, sodass bei dieser Spannung trotz eines eventuell vorhandenen Aktivators kein Nettoflux besteht (Abb. 1.2)

Bei geringeren angelegten Spannungen kommt es aufgrund der nun ins Zellinnere gerichteten elektrochemischen Triebkraft zu Einwärtsströmen beziehungsweise bei einem positiveren Membranpotential zu Auswärtsströmen, vorausgesetzt, der Kanal zeigt eine ausreichend hohe Offenwahrscheinlichkeit.

Der Ionenfluss durch einen Kanal hängt somit einerseits von der elektrochemischen Triebkraft und andererseits von der Offenwahrscheinlichkeit, die wiederum durch den Aktivierungszustand bedingt ist, ab.

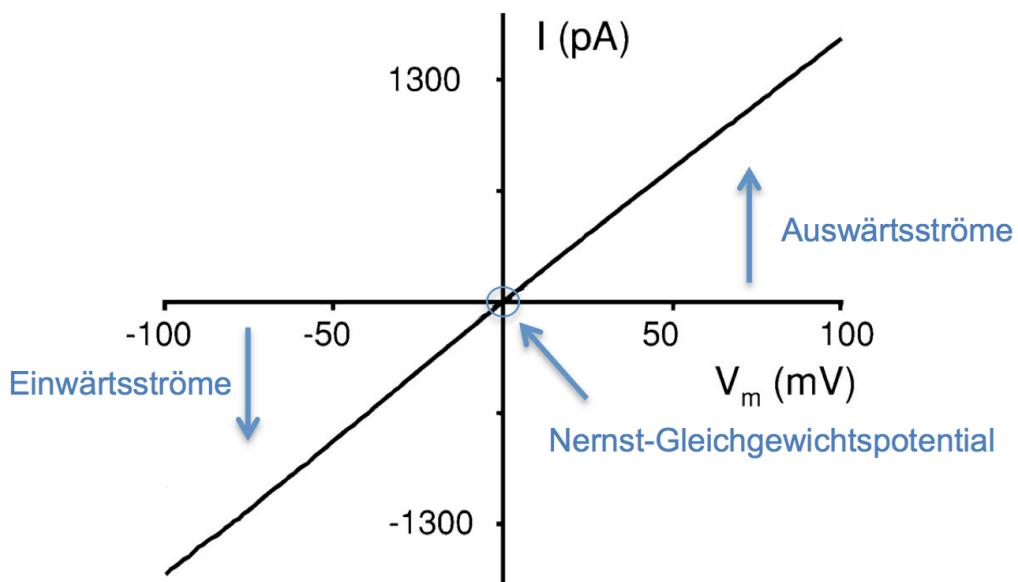


Abb. 1.2: Strom-Spannungskurve eines Ionenkanals (modifiziert nach Fuller et al. (2004)). Zu sehen ist eine Spannungsrampe. Bei einer negativ angelegten Spannung ist bei äquimolaren intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen die elektrochemische Triebkraft nach intrazellulär gerichtet, weshalb es zu Einwärtsströmen kommt. Entsprechend existieren bei positiv angelegten Spannungen Auswärtsströme. Am Nernst-Gleichgewichtspotential (unter den genannten Bedingungen bei 0 mV) herrscht kein Nettoflux.

1.2 Patch-Clamp-Technik

Der entscheidende Durchbruch der Elektrophysiologie, Ionenkanäle biophysikalisch zu untersuchen und zu charakterisieren, war die Entwicklung der Patch-Clamp-Technik, die auch wir für unsere Experimente benutzt haben. Sie geht zurück auf E. Neher und B. Sakmann (Neher und Sakmann, 1976), die für ihre Entwicklung 1991 mit dem Nobelpreis in Physiologie oder Medizin ausgezeichnet wurden. Unsere heutigen verwendeten Techniken basieren zudem auf den Weiterentwicklungen von Hamill et al. (1981).

Es werden vier verschiedene Methoden unterschieden. Alle Methoden beginnen mit dem Anpressen der mit Pipettenlösung gefüllten Glaspipette an die intakte Zellmembran, wodurch ein Gigaseal, ein Abdichtungswiderstand im Gigaohm-Bereich, der den Patch elektrisch isoliert, entsteht. Dieser als cell-attached- beziehungsweise on-cell-Konfiguration bezeichnete Modus (Abb. 1.3A) dient Messungen an der intakten Zelle oder als Ausgangsmodus für die folgenden Konfigurationen.

Für die von uns verwendete inside-out- beziehungsweise excised-Patch-Konfiguration wird der Patch aus der Zelle herausgezogen, wobei nun die Zytosolseite der Membran der Badlösung zugewandt ist und somit unsere Badlösung beziehungsweise die Lösungen des Applikationssystems der intrazellulären Lösung entsprechen, während unsere Pipettenlösung auf der extrazellulären Seite liegt (Abb. 1.3B). Dies ermöglichte uns, den Effekt von zytosolisch applizierten Substanzen zu untersuchen.

Alternativ kann ausgehend vom cell-attached-Modus durch kurzes Saugen die Membran in der Pipette durchbrochen werden und Ganzzellströme gemessen werden (whole-cell-Konfiguration, Abb. 1.3C). Durch Herausziehen der Pipette gelangt man in die outside-out-Konfiguration, wobei hierbei nach Bilden des Membranbläschens die Membranaußenseite der Badlösung zugewandt ist (Abb. 1.3D). In den beiden letztgenannten Konfigurationen sind Effekte von extrazellulär zugeführten Substanzen bestimmbar.

Die Patch-Clamp-Technik hat in den vergangenen Jahrzehnten einen enormen Wissensgewinn bezüglich unter anderem des Gatings und der Kinetik von Aktivatoren und Inhibitoren von Ionenkanälen geschaffen. Dadurch konnten neue pharmakologische

sche Angriffspunkte erkannt werden, die eine große Rolle in der Medizin spielen, da Ionenkanäle in der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt sind.

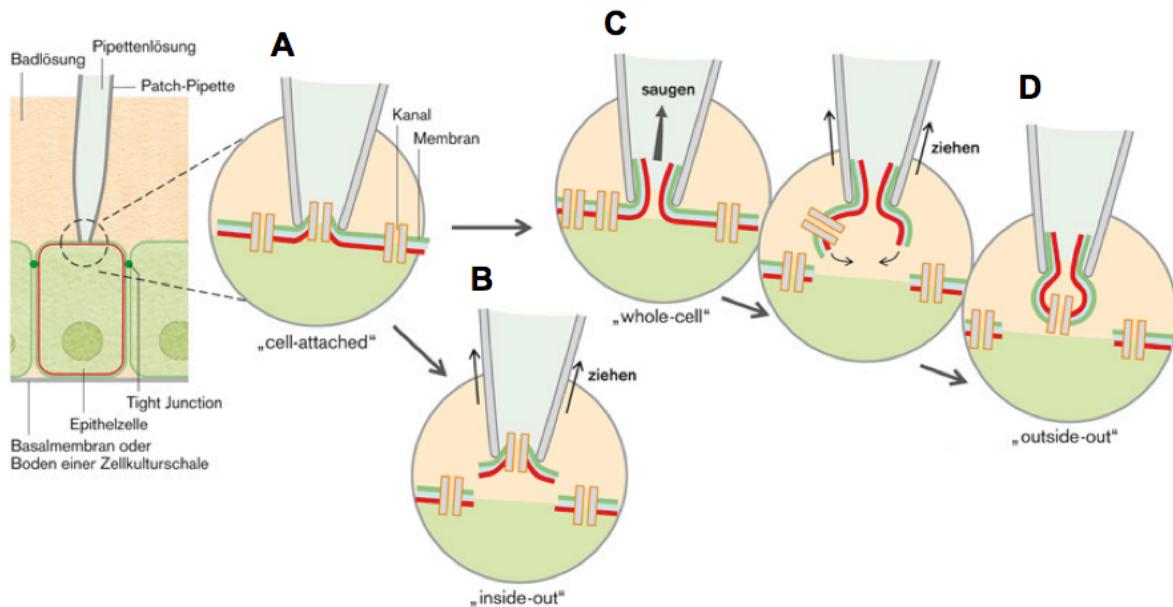


Abb. 1.3: Patch-Clamp-Konfigurationen (Klinke et al., 2010). Ausgehend vom cell-attached-Modus (**A**) gelangt man durch Herausziehen des Patches in die inside-out-Konfiguration (**B**) oder durch Saugen in die whole-cell-Konfiguration (**C**). Das Herausziehen in der whole-cell-Konfiguration bewirkt eine Bläschenbildung, wodurch die outside-out-Konfiguration entsteht (**D**).

1.3 Kaliumionenkanäle

Die in dieser Arbeit untersuchten Ionenkanäle sind Kaliumkanäle. Jede Zelle unseres Körpers besitzt Kaliumkanäle, die essentiell für das Leben einer Zelle sind. Sie bilden die größte Klasse aller Ionenkanäle und sind durch ihre große Vielfalt gekennzeichnet.

Durch ihr negatives Gleichgewichtspotential (bedingt durch die sehr geringe Kaliumkonzentration im Extrazellulärtraum) stabilisieren sie in erregbaren Zellen wie Sinneszellen, Nervenzellen und Muskelzellen das Membranpotential, hemmen deren Erregbarkeit oder beenden ein Aktionspotential, vorausgesetzt die Kanäle sind geöffnet, was zum Beispiel in der Anästhesie gewünscht ist. Im Gegensatz dazu führen Inhibitoren der Kaliumkanäle zu einer gesteigerten Erregbarkeit von Zellen.

Kaliumkanäle werden aber nicht nur in erregbaren Zellen, sondern auch in jeder anderen Zelle exprimiert. In Epithelien beispielsweise besitzen sie eine Transportfunktion (Hille, 2001).

Man kann die Kaliumkanäle in drei große Gruppen, die sich hinsichtlich ihrer Architektur unterscheiden (Choe, 2002), klassifizieren. Dazu zählen die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K_v), die einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle (K_{ir} , inward rectifiers) und die Zwei-Poren-Domänen Kaliumkanäle (K2P, Two-pore domain). Allen gemeinsam sind zwei Transmembranhelices und ein Pore-Loop dazwischen (2TM/P), welche das Markenzeichen aller Kaliumkanäle bilden (Lu et al., 2001). Diese Struktur wurde erstmals am bakteriellen Kaliumkanal KcsA mithilfe der Röntgenstrukturanalyse entdeckt (Doyle et al., 1998).

K_v -Kanäle: Spannungsabhängige Kaliumkanäle bestehen aus sechs Transmembrandomänen (TM) und einer porenbildenden Region (P), die sich zwischen TM5 und TM6 befindet (Abb. 1.4A). Vier solcher Monomere bilden den quarternären Proteinkomplex, wodurch die vier P-Loops durch Tetramerisierung zusammengefügt werden und die Pore mit dem Selektivitätsfilter bilden. (Tempel et al., 1987, Pongs et al., 1988, Kamb et al., 1988). Kennzeichnend ist das S4-Segment, das als Spannungssensor fungiert, indem es bei Depolarisation aufgrund der gehäuft enthaltenden positiv geladenen Aminosäuren in Richtung Extrazellulärraum getrieben wird und durch diese Konformationsänderung zur Öffnung der Pore führt (Cha et al., 1999, Glauner et al., 1999).

Die Nomenklatur ist K_v n.m., wobei n die Subgruppe und m das Mitglied bezeichnet (Chandy, 1991). Die Subgruppe K_v 1.m wird Shaker genannt.

K_{ir} -Kanäle: Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle bestehen aus zwei Transmembrandomänen und eine die beiden Transmembrandomänen verbindende Porenregion (Abb. 1.4B) (Ho et al., 1993, Kubo et al., 1993). Vier solcher Untereinheiten sind notwendig, um den funktionellen Kanal zu bilden (Glowatzki et al., 1995, Yang et al., 1995). Kennzeichnend für diese Kaliumkanalklasse ist die Einwärtsgleichrichtung, also eine hohe Leitfähigkeit bei Potentialen, die negativ vom Umkehrpotential liegen, und eine schwache beziehungsweise keine Leitfähigkeit für positivere Potentiale. Dadurch wird das Ruhemembranpotential stabilisiert, ohne einer Depolarisation im Rahmen beispielsweise eines Aktionspotentials entgegenzuwirken. Molekulare Grundlage sind positiv geladene Ionen (Mg^{2+} , Polyamine wie Spermin oder Spermidin), die spannungsabhängig den Kanal blockieren (Matsuda et al., 1987,

Vandenberg, 1987, Ficker et al., 1994, Lopatin et al., 1995, Fakler et al., 1995, Oliver et al., 2000).

Die Einteilung erfolgt – wie bei den K_v -Kanälen – in Subgruppen und entsprechende Mitglieder (Doupnik et al., 1995).

K2P-Kanäle: siehe Kapitel 1.4 und Abb. 1.4C

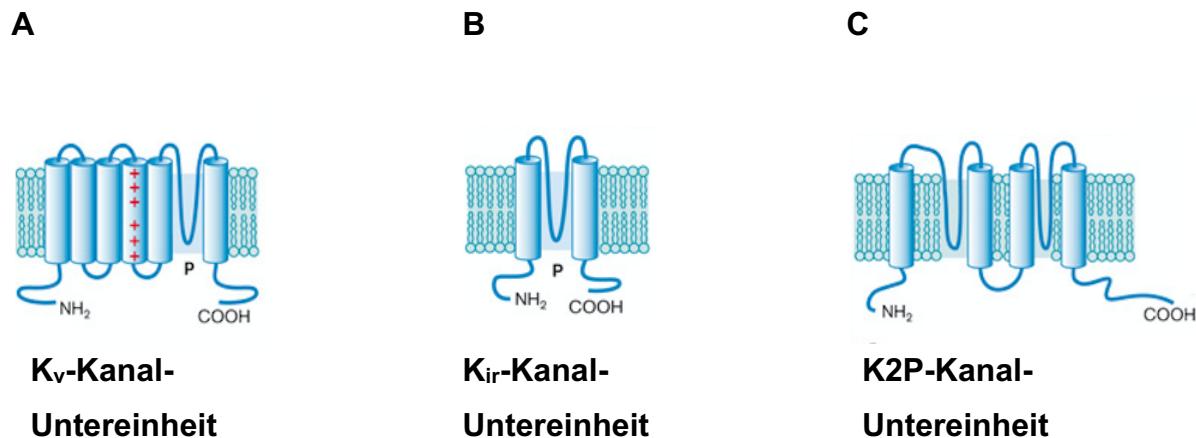


Abb. 1.4: Aufbau der drei Kaliumkanalklassen (Klinke et al., 2010). (A) Vier K_v -Kanal-Untereinheiten bilden einen spannungsabhängigen Kaliumkanal. Jede Untereinheit besteht aus sechs TM und einem P-Loop. Die roten Plus-Zeichen kennzeichnen das S4-Segment, den Spannungssensor. (B) Vier K_{ir} -Kanal-Untereinheiten bilden einen einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanal. Jede Untereinheit besteht aus zwei TM und einem P-Loop. (C) Zwei K2P-Kanal-Untereinheiten bilden einen Zwei-Poren-Domänen-Kaliumkanal. Jede Untereinheit besteht aus vier TM und zwei P-Loops.

1.4 Aufbau von K2P-Kanälen

Die in dieser Arbeit untersuchte K2P-Familie ist die jüngste der bisher erforschten Kaliumionenkanalklassen. Schon seit Mitte des 20. Jahrhunderts ist bekannt, dass es eine hohe Leitfähigkeit für den Kaliumauswärtsstrom gibt, der als „Leckstrom“ bezeichnet wurde (Hodgkin und Huxley, 1947). Das physiologische Korrelat dieser Leckströme wurde erstmals 1996 gefunden (Fink et al., 1996) und die Struktur des ersten Zwei-Poren-Domänen-Kanals, des TWIK-1, identifiziert (Lesage et al., 1996). Bis zum Jahr 2003 wurden 14 weitere Kanäle entdeckt. Die 15 bekannten K2P-Kanäle werden anhand ihrer Ähnlichkeit in Sequenz und Funktion in sechs Untergruppen unterteilt (TWIK, TREK, TASK, TALK, THIK und TRESK) (Abb. 1.5 und Tab. 1). Die systematische Nomenklatur bezieht sich einerseits auf die Gennamen

der Kanäle (zum Beispiel KCNK17 für TALK-2) und andererseits auf die Proteine (zum Beispiel K_{2P}17.1 für TALK-2) (Goldstein et al., 2005). In dieser Arbeit werden jedoch die gebräuchlichen Namen verwendet.

Obwohl die Sequenzähnlichkeiten zwischen den Untergruppen nur sehr gering sind und daher eine hohe funktionelle Diversität besteht, besitzen alle K2P-Kanäle die gleiche generelle molekulare Architektur (Enyedi und Czirjak, 2010).

Jede Untereinheit besteht aus vier Transmembrandomänen und zwei Porendomänen (Lesage et al., 1996, Brohawn et al., 2012, Miller und Long, 2012) (Abb. 1.4C). Da vier P-Domänen für einen funktionellen Kaliumkanal nötig sind, sind sie die einzigen Kaliumkanäle, die dimerisieren (Brohawn et al., 2012, Miller und Long, 2012).

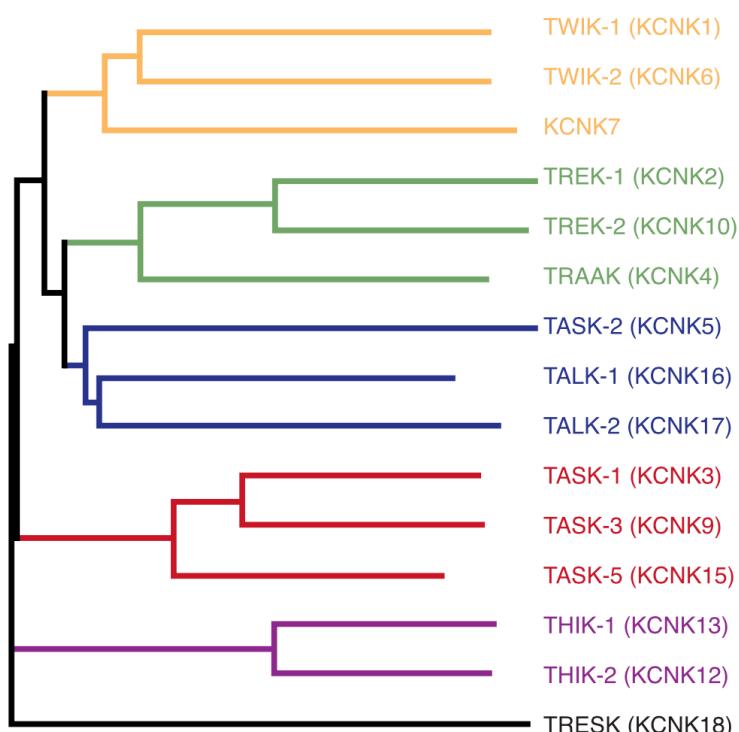


Abb. 1.5: Dendrogramm der menschlichen K2P-Kanäle (Enyedi und Czirjak, 2010).

Abkürzung	Bezeichnung
TWIK	Two pore weakly inward rectifying K ⁺ -Kanal
TREK	TWIK-related K ⁺ -Kanal
TASK	TWIK-related acid sensitive K ⁺ -Kanal
TALK	TWIK-related alkaline pH activated K ⁺ -Kanal
THIK	Tandem pore domain halothane inhibited K ⁺ -Kanal
TRESK	TWIK-related spinal cord K ⁺ -Kanal

Tab. 1: Bezeichnung der K2P-Subfamilien.

1.5 Gating von K2P-Kanälen

Es werden verschiedene Gating-Mechanismen unterschieden. Während bei den K_v- und K_{ir}-Kanälen sowohl ein unteres Gate (das sogenannte Helix-Bundle-Crossing) (Yellen, 2002, Phillips und Nichols, 2003, Swartz, 2004, Zhang et al., 2006, Rapedius et al., 2007, Hibino et al., 2010) als auch ein oberes Gate (der Selektivitätsfilter) existieren (Schulte et al., 2001, Yellen, 2002), wird angenommen, dass das Helix-Bundle-Crossing bei den K2P-Kanälen als innerer Gating-Mechanismus fehlt (Piechotta et al., 2011, Bagriantsev et al., 2011, Bagriantsev et al., 2012, Brohawn et al., 2012, Miller und Long, 2012). Wie Piechotta et. al. zeigen, ist das Helix-Bundle-Crossing auch im geschlossenen Zustand des Kanals offen, sodass von intrazellulär ein zustandsunabhängiger Zugang zur Kanalkavität, dem Raum unterhalb des Selektivitätsfilters, besteht. Daraus wurde geschlossen, dass das primäre Aktivierungs-Gate nahe beim oder im Selektivitätsfilter liegen muss.

Zum besseren Verständnis wird im Folgenden der Ionenfluss durch die Pore eines K2P-Kanals geschildert (Doyle et al., 1998, MacKinnon, 2004, Piechotta, 2014):

Das Kaliumion gelangt ausgehend vom Intrazellulärraum ungehindert durch das Helix-Bundle-Crossing in die Kanalkavität, wo es von acht Wassermolekülen hydratisiert ist und wo noch keine Ionenselektivität besteht. Letztere wird vom Selektivitätsfilter geleistet, der äußerst schmal ist, sich im äußeren Drittel der Membran befindet und vier Kaliumbindungsstellen (S1-S4) enthält (Abb. 1.6). Daneben bestehen noch drei weitere Bindungsstellen, S0 auf der extrazellulären Seite, S5 auf der intrazellulären Seite und S6 in der Kavität.

Beim Eintreten des Kaliumions in den Selektivitätsfilter kommt es zur Dehydratation von Wassermolekülen. Deren Aufgabe übernehmen Sauerstoffatome der Carbonylverbindungen des Aminosäurerückgrats an S1 bis S3 und die Hydroxylgruppe der Threonine an S4. Nach Durchlaufen der Bindungsstellen gelangt das Kaliumion in den Extrazellulärtraum.

Für Natriumionen ist dieser Vorgang aufgrund einerseits ihrer höheren Dehydrationsenergie und andererseits ihrer geringen Größe, wodurch die Koordinierung durch die Carbonyl-Sauerstoffatome nicht gelingt, nicht möglich.

Aktivatoren greifen aber nicht zwangsläufig direkt am Gate, also am Selektivitätsfilter, an. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure, die als Aktivatoren für bestimmte K₂P-Kanäle bekannt sind, wirken beispielsweise über eine induzierte Membranspannung, was als Mechanogating bezeichnet wird (Dong et al., 2015).

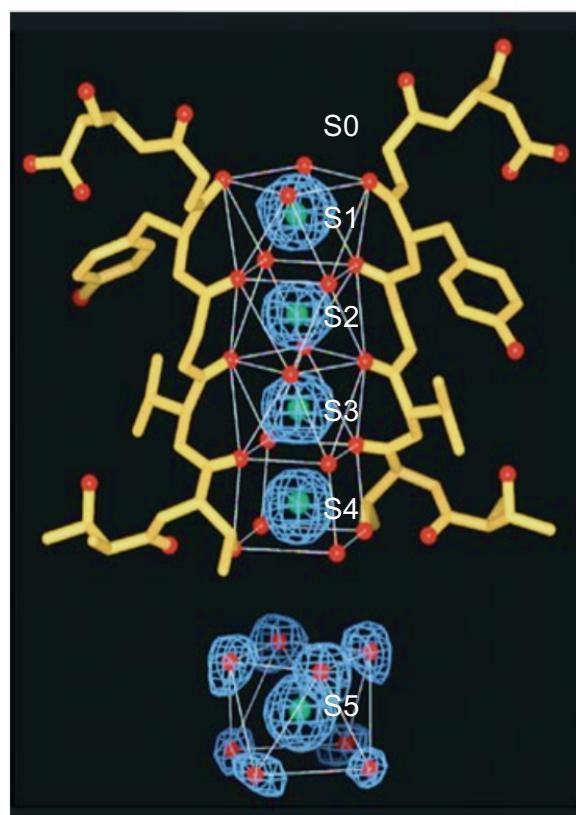


Abb. 1.6: Selektivitätsfilter bei Kaliumkanälen am Beispiel vom KcsA (modifiziert nach Choe (2002)). S0-S5 entsprechen den Kaliumbindungsstellen, nummeriert von außen nach innen. Kaliumionen (grün) werden in S1 bis S3 jeweils von acht Sauerstoffatomen (rot) von Carbonylverbindungen, in S4 von der Threoninseitenkette und in S5 von Sauerstoffatomen von Wassermolekülen umgeben. Die Carbonylverbindungen und die Threonine werden in K₂P-Kanälen von den vier P-Loops der beiden Untereinheiten bereitgestellt.

1.6 Regulation von K2P-Kanälen

Bevor die K2P-Kanäle charakterisiert werden konnten, wurden sie als Leckkanäle mit konstitutiv offenen und unregulierten Poren beschrieben. Nachdem sie näher erforscht wurden, wurde aber schnell klar, dass sie streng regulierte Kanäle darstellen, die einen entscheidenden Effekt auf das Ruhemembranpotential jeder Zelle haben. Heute weiß man, dass die K2P-Kanäle polymodal reguliert sind und unter anderem durch physikochemische Parameter wie pH, Temperatur, Membrandehnung und Phospholipide und auch durch eine Vielzahl an intrazellulären Signalwegen moduliert werden.

Regulation durch pH. Abgesehen von THIK-1,-2 und TRESK sind alle K2P-Kanäle pH-sensitiv. Für die Kanäle der TASK- und TALK-Familien ist bekannt, dass sie durch extrazelluläre Azidifizierung inhibiert werden (Duprat et al., 1997, Kim et al., 2000, Rajan et al., 2000) und dass die Kanäle der TALK-Familie und TASK-1 zugleich durch extrazelluläre Alkalinisierung aktiviert werden (Duprat et al., 1997, Reyes et al., 1998, Kang und Kim, 2004). TASK-2 wird zudem durch intrazellulären alkalischen pH aktiviert (Niemeyer et al., 2010). Das Verhalten von TALK-2 bei Veränderung des intrazellulären pHs wird im Kapitel 3.1.1 untersucht. Die Kanäle der TREK-Familie zeigen demgegenüber kein einheitliches Verhalten bezüglich der pH-Regulation. TREK-1 und TRAAK werden durch extrazellulären sauren pH inhibiert, während TREK-2 dadurch aktiviert wird (Cohen et al., 2008, Sandoz et al., 2009). Intrazellulärer saurer pH aktiviert wiederum TREK-1 und auch TREK-2, nicht jedoch TRAAK, der durch internen alkalischen pH stimuliert wird (Maingret et al., 1999, Kim et al., 2001a, Kim et al., 2001b). TWIK-1 wird ebenso durch Veränderungen des pH-Werts beeinflusst, indem er durch intrazelluläre Azidifizierung inhibiert wird (Lesage et al., 1996) und interessanterweise durch extrazelluläre Azidifizierung seine Kaliumselektivität verliert und Natrium-permeabel wird, was zur Depolarisation führen kann (Chatelain et al., 2012). TWIK-1 zeigt demnach eine dynamische Ionenselektivität, weshalb sich K2P-Kanäle folglich auch als exzitatorische Kanäle verhalten können.

Regulation durch Temperatur. TREK-1, TREK-2 und TRAAK (somit die komplette TREK-Familie) werden durch Änderung der Temperatur reguliert. Hitze wirkt stark

aktivierend. Ein Temperaturanstieg von 10 °C verstärkt den TREK-1-Strom um ungefähr das Siebenfache (Maingret et al., 2000, Kang et al., 2005).

Regulation durch Membrandehnung. Membrandehnung, beispielsweise ausgelöst durch eine Zunahme des Zellvolumens, bewirkt eine Aktivierung bei TREK-1, TREK-2 und TRAAK (Patel et al., 1998, Maingret et al., 1999, Lesage et al., 2000). Diese mechanische Sensitivität wird durch Konformationsänderungen der Transmembranhelices TM2, TM3 und TM4 bewirkt (Brohawn et al., 2014).

Regulation durch intrazelluläre Signalwege. Im Rahmen der Regulation der K2P-Kanäle durch Signaltransduktionen spielt die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch Hormone oder Neurotransmitter eine große Rolle. Werden sogenannte „Siebentransmembrandomänen-Rezeptoren“ (7-TM, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) stimuliert, wird ausgehend vom an diesem Rezeptor gekoppelten G-Protein eine Signaltransduktion eingeleitet. Man unterscheidet G_s -, G_i - und G_q -Proteine, die aus jeweils drei Untereinheiten aufgebaut sind (Heterotrimere). Durch die Stimulation des Rezeptors bindet GTP anstelle von GDP an die α -Untereinheit des G-Proteins, wodurch die α -Untereinheit von der $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziiert und ein nachfolgendes Enzym aktiviert.

Bei Stimulation von G_s -Proteinen wird die membranständige Adenylylatcyclase aktiviert, die cAMP herstellt, welches die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, die durch Phosphorylierung weitere Proteine in ihrer Aktivität beeinflusst. Bei Stimulation von G_i -Proteinen wird die Adenylylatcyclase gehemmt, was ein Absinken des cAMP-Spiegels in der Zelle zur Folge hat. Die Stimulation von G_q -Proteinen bewirkt die Aktivierung der Phospholipase C (PKC), die das in der Plasmamembran enthaltene Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) spaltet. IP_3 führt durch Aktivierung eines Calciumkanals zur Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum, während DAG die Proteinkinase C aktiviert, die ähnlich der Proteinkinase A weitere Proteine durch Phosphorylierung reguliert.

TASK-Kanäle werden durch Stimulation von G_q -gekoppelten Rezeptoren inhibiert (Chen et al., 2006) und auch TREK-1 und TREK-2 werden durch Stimulation der G_q -aktivierten PKC und G_s -aktivierten PKA inhibiert (Fink et al., 1996), wobei auch die G_q -vermittelte Spaltung von PIP_2 für die Inhibition verantwortlich sein könnte (Lopes

et al., 2005). Des Weiteren bewirkt die PKC auch beim TWIK-1 eine Inhibition (Lesage et al., 1996). Neben der Wirkung von PKA und PKC, die die Kanäle am C-Terminus an für jede Kinase spezifischen Stellen phosphorylieren (Murbartian et al., 2005, Kang et al., 2006), kann die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins möglicherweise direkt an den C-Terminus vom TASK-2 beziehungsweise TREK-1 mit gegenteiligem Effekt binden. TASK-2 wird inhibiert (Anazco et al., 2013), TREK-1 wird aktiviert (Woo et al., 2012). Der TRESK-Kanal ist an die intrazelluläre Calciumkonzentration gekoppelt und wird durch deren Anstieg aktiviert (Czirjak et al., 2004).

Regulation durch Pharmaka. Aufgrund der großen physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung der K2P-Kanäle (siehe Kap. 1.8) hatte und hat die Suche nach regulatorischen Substanzen einen hohen Stellenwert. Inhalationsnarkotika wie Halothan, Isofluran oder Chloroform sind als Regulatoren einer Vielzahl von K2P-Kanälen bekannt. So werden TREK-1 und TREK-2 wie auch TASK-1 und TASK-3 und TRESK von dieser Substanzklasse aktiviert (Patel et al., 1999, Talley und Bayliss, 2002, Liu et al., 2004), während die THIK-Subfamilie inhibiert wird (Rajan et al., 2001, Chatelain et al., 2013). Das neuroprotektiv-wirkende Pharmakon Riluzol, das mit seinen antikonvulsiven, sedativen und anti-ischämischen Eigenschaften in der Therapie der Amyotrophen Lateralsklerose eingesetzt wird, wurde als Aktivator von TREK-1 und TRAAK beschrieben (Duprat et al., 2000). Für die bisher wenig untersuchten TALK-Kanäle konnten NO und andere reaktive Sauerstoff-Spezies als Aktivatoren beschrieben werden (Duprat et al., 2005). Für das als Inhibitor von IP₃-induzierter Calcium-Freisetzung bekannte 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) (Maruyama et al., 1997) wurde 2013 gezeigt, dass es sowohl TREK-1 als auch TREK-2 und TRAAK aktiviert (Beltran et al., 2013). Im Kapitel 3.1.3 wird die Wirkung von 2-APB am TALK-2-Kanal erstmals beschrieben.

Innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte wurden auch eine ganze Reihe K2P-blockierender Moleküle identifiziert. Das Antidepressivum Fluoxetin beispielweise, das zur Gruppe der Selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) zählt, inhibiert TREK-1- und TREK-2-Kanäle (Kennard et al., 2005, Kang et al., 2012). Weitere Inhibitoren vom TREK-1 sind Amlodipin, Antipsychotika wie Haloperidol, Cisplatin, Lidocain, Methionin und quartäre Ammoniumionen (Liu et al., 2007, Thummler et al., 2007, Nayak et al., 2009, Milosavljevic et al., 2010, Monaghan et al., 2011, Piechotta et al., 2011). Letztgenannte wurden von Piechotta et. al. (2011) als direkte Porenblo-

cker vorgestellt und als Hilfsmittel eingesetzt, um neue Erkenntnisse der Porenstruktur und des Gatings von K2P-Kanälen ableiten zu können. Das quartäre Ammonium Tetrapentylammonium (TPA^+) wird auch in dieser Arbeit Verwendung finden (Kap. 3.1.4).

Regulation durch Lipide. Im Gegensatz zu Pharmaka sind Lipide endogene Regulatoren, weshalb deren Erforschung eine hohe physiologische wie auch pathophysiologische Relevanz besitzt. Es ist bekannt, dass K2P-Kanäle für verschiedene Lipide sensitiv sind. So führen Arachidonsäure und andere mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu einer Aktivierung von TREK-1 (Patel et al., 1998), TREK-2 (Bang et al., 2000) und TRAAK (Fink et al., 1998), während sie auf TRESK-Kanäle inhibitorisch wirken (Sano et al., 2003). Die Regulation durch Membranlipide wird im folgenden Unterkapitel besprochen.

1.7 Regulation von Kaliumkanälen durch Membranlipide

In dieser Arbeit wurde die Regulation von Membranlipiden an K2P-Kanälen untersucht. Die Resultate werden im zweiten Teil des Ergebnisse-Kapitels dargestellt. Vornehmlich geht es um den Einfluss von Phospholipiden und Coenzym A-Derivaten (Acyl-CoA) auf die Regulation von K2P-Kanälen, wobei die Bedeutung letzterer für die K2P-Kanäle bisher nicht bekannt ist.

Der nachfolgende Abschnitt soll einen Überblick über diese beiden Lipidklassen geben und das derzeitige Wissen über deren Einfluss auf Kaliumkanäle erläutern.

Eine große Gruppe der nativen Membranlipide bilden die Phospholipide. Dies sind amphiphile Moleküle mit einem hydrophoben Teil, bestehend aus Glycerin und zwei Fettsäuren, die am ersten und zweiten C-Atom jeweils mit den Hydroxylgruppen des Glycerins verestert sind, und einer hydrophilen Kopfgruppe, die über eine Phosphodiesterbindung mit dem dritten C-Atom des Glycerins verbunden ist. Typische Vertreter dieser Kopfgruppe sind Cholin (Phosphatidylcholin, Lecithin), Serin (Phosphatidylserin), Ethanolamin (Phosphatidylethanolamin) - die beiden letzten zählen zu den Kephalinen - oder auch Inositol (Phosphatidylinositol, PI).

Phosphatidylinositole und deren Derivate bilden zwar nur einen kleinen Teil der Membranphospholipide, spielen aber in regulatorischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Durch PI-Kinasen und-Phosphatasen werden Hydroxylgruppen des Inositolrings phosphoryliert beziehungsweise dephosphoryliert, wodurch verschiedene Phosphatidylinositolphosphate entstehen

Eine zentrale Stellung nimmt das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (im weiteren Verlauf als PIP₂ bezeichnet, Abb. 1.7) ein, das neben der Regulation des Zytoskeletts und Membranverkehrs wichtige Funktionen in der Signaltransduktion von Zellen besitzt (Hilgemann et al., 2001, Yamamoto et al., 2001). Nach Stimulation eines G_q-Protein-gekoppelten Rezeptors wird, wie oben bereits beschrieben, die Phospholipase C aktiviert, welche PIP₂ in IP₃ und DAG spaltet. IP₃ wiederum stimuliert die Calcium-Freisetzung aus dem glatten endoplasmatischen Retikulum, während DAG die Proteinkinase C aktiviert, die wiederum die Aktivität weiterer Proteine beeinflusst.

PIP₂ hat aber auch Einfluss auf die Aktivität von Kaliumionenkanälen. So werden alle K_i-Kanäle von Phosphoinositolen (vor allem von PIP₂) reguliert (Baukowitz et al., 1998, Huang et al., 1998, Lopes et al., 2002) und auch bestimmte K2P-Kanäle wie TREK-1 werden durch PIP₂ und andere Phospholipide wie Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin stimuliert (Chemin et al., 2005, Lopes et al., 2005, Honore, 2007)

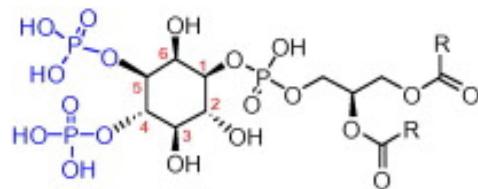


Abb. 1.7: Strukturformel von PIP₂ (Schifferer et al., 2015). R entspricht einem Acyl-Rest. Beachte: Die Phosphatgruppen sind in dieser Abbildung protoniert.

Eine weitere physiologisch bedeutsame Lipidklasse stellt das langkettige Acyl-Coenzym A (Acyl-CoA, long-chain acyl-coenzyme A, LC-CoA) dar, welches in der Regulation von K_i-Kanälen bereits beschrieben wurde (Larsson et al., 1996, Branstrom et al., 1998, Gribble et al., 1998, Liu et al., 2001, Rohacs et al., 2003, Rapedius et al., 2005) und in dieser Arbeit erstmals an K2P-Kanälen untersucht wur-

de. Acyl-CoA/LC-CoA besteht aus einer Fettsäure, die über eine Thioesterbindung mit Coenzym A verbunden ist (Abb. 1.8). Die strukturelle Ähnlichkeit zu PIP₂ besteht darin, dass es ebenfalls eine hydrophile Kopfgruppe mit drei Phosphatresten im Rahmen des zum Coenzym A gehörenden ADP-Teilmoleküls und durch die Fettsäure einen hydrophoben Teil enthält. Je nachdem welche Fettsäure enthalten ist, unterscheidet man unterschiedliche Acyl-CoA: Das in dieser Arbeit des Öfteren verwendete Oleoyl-CoA enthält Ölsäure als Fettsäure. Ölsäure besteht aus 18 C-Atomen mit einer Doppelbindung an Position C9.

LC-CoA nehmen eine wichtige Rolle im Metabolismus jeder Zelle ein, indem sie im Zytosol aus Fettsäuren hergestellt werden und unter anderem nach Transport ins Mitochondrium Ausgangssubstanzen für die β-Oxidation darstellen.

Weitere Aufgaben von LC-CoA betreffen die Gentranskription, den Membranverkehr (Zammit, 1999) und die Aktivierung von endoplasmatischen Calcium-ATPasen und Proteinkinasen C (Deeney et al., 2000).

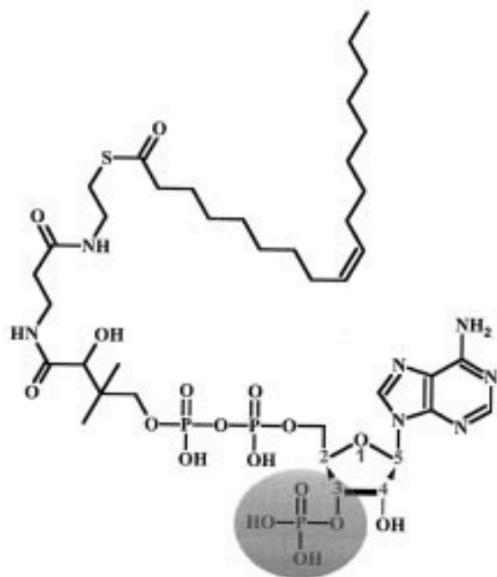


Abb. 1.8: Struktur von LC-CoA (Rapedius et al., 2005). Struktur von LC-CoA am Beispiel von Oleoyl-CoA.

1.8 Physiologie und Pathophysiologie von K2P-Kanälen

Die Rolle der K2P-Kanäle besteht in erster Linie in der Kontrolle des Membranpotentials und damit der zellulären Erregbarkeit, weshalb sie in einer Vielzahl von biologischen Funktionen einen wichtigen Stellenwert besitzen. Die K2P-Kanäle zeichnen sich durch ein sehr unterschiedliches Expressionsmuster aus. Während etwa der TWIK-1-Kanal fast ubiquitär exprimiert wird, kommt der TALK-1 fast ausschließlich im exokrinen Pankreas vor.

Da hochaffine und selektive Pharmaka für K2P-Kanäle gegenwärtig kaum vorhanden sind, konnten Untersuchungen über die physiologische Bedeutung der einzelnen K2P-Kanäle durch klassische pharmakologische Herangehensweisen nur sehr eingeschränkt durchgeführt werden. Unsere heutigen Erkenntnisse basieren deshalb vor allem auf Studien mit transgenen Tiermodellen, insbesondere auf Mäusen mit inaktivierten KCNK-Genen (Sabbadini und Yost, 2009).

Im Folgenden sollen einige physiologische und pathophysiologische Aspekte, in denen K2P-Kanäle eine entscheidende Rolle spielen, erläutert werden.

TREK-Kanäle nehmen eine Schlüsselposition in der Pathophysiologie von Depression, Schmerz und neurodegenerativer Schädigung ein, was aufzeigt, dass sie eine wichtige Rolle im breiten Spektrum von ZNS-Erkrankungen einnehmen (Bittner et al., 2014).

Die TREK-Subfamilie ist an der Nozizeption beteiligt. In Nozizeptorneuronen der DRG (dorsal root ganglia) werden die Kanäle durch thermische und mechanische Nozizektion stimuliert, was zur Hyperpolarisation und somit zur Abschwächung des Signals führt. Daher zeigen TREK-Knockout-Mäuse unter bestimmten Bedingungen gehäuft Hyperalgesie, weshalb TREK-Kanäle mögliche Angriffspunkte in der Entwicklung neuer Analgetika darstellen (Alloui et al., 2006, Noel et al., 2009, Pereira et al., 2014).

Durch Knockout von durch Inhalationsanästhetika aktivierte TREK-1, TASK-1 und -3 entstanden Anästhesie-resistente Phänotypen (Heurteaux et al., 2004, Linden et al., 2006, Linden et al., 2007).

Das Öffnen der TREK-1-Kanäle durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren verringert Zellexzitation und damit Exzitotoxizität, was zu neuroprotektiven Effekten bei zerebraler Ischämie führt (Heurteaux et al., 2004).

TREK-1 kann als potentielles Zielprotein für Antidepressiva angesehen werden, da es an der Serotonin-Freisetzung beteiligt ist (Heurteaux et al., 2006, Borsotto et al., 2015). Bei TREK-1-Knockout-Mäusen war die Serotonin-Freisetzung erhöht, was zu einem depressionsresistenten Phänotyp führte. Durch Inhibition von TREK-1 konnte dieser Phänotyp ebenfalls erzielt werden (Moha Ou Maati et al., 2012).

Eine weitere Folge einer Inaktivierung von TREK-1 ist eine Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke mit resultierender erhöhter Infiltration von Leukozyten ins Gehirn bei einer bestehenden autoimmunen Enzephalomyelitis. Durch Gabe des TREK-1-Aktivators Riluzol konnten die Symptome abgeschwächt werden (Bittner et al., 2013, Bittner et al., 2014).

Es konnte gezeigt werden, dass TASK-1 und -3, die durch Azidose und Hypoxie inhibiert werden, eine wichtige Rolle in der Chemorezeption im Glomus caroticum spielen (Buckler et al., 2000, Kemp et al., 2004, Kim et al., 2009). Des Weiteren sollen sie an der Sensitivität des Sauerstoffpartialdrucks in pulmonalen neuroepithelialen Zellen beteiligt sein (Hartness et al., 2001).

TASK-2, der unter anderem in Neuronen des retrotrapezoiden Kerns exprimiert wird, besitzt eine Rolle in der zentralen Chemosensitivität von Sauerstoff (Gestreau et al., 2010).

TASK-2 befindet sich auch in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus der Niere und ist dort, wie Untersuchungen an Knockout-Mäusen zeigen konnten, an der Resorption von Bikarbonat (HCO_3^-) und den begleitenden Natrium- und Wasserbewegungen beteiligt. Wie Abb. 1.9 zeigt, kommt es durch eine erhöhte Bikarbonatresorption der proximalen Tubuluszellen zu einer Alkalinisierung des basolateralen Kompartiments, was zur Aktivierung der TASK-2-Kanäle führt und durch Hyperpolarisation der basolateralen Membran die Triebkraft des Natrium-Bikarbonat-Exports durch den $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter aufrechterhält. TASK-Knockout-Mäuse zeigten eine beeinträchtigte Bikarbonat-Resorption mit der Folge einer metabolischen Azido-

se und eines verminderten Blutdrucks aufgrund der fehlenden Natrium- und Wasserresorption (Warth et al., 2004, L'Hoste et al., 2007).

Neben TASK-2 haben auch TALK-1 und TALK-2 eine entscheidende Bedeutung in der Bikarbonatsekretion im exokrinen Pankreas. Das dabei durch Chloridsekretion entstandene lumennegative Potential wird durch Kaliumefflux durch Kanäle der TALK-Subfamilie an der luminalen Membran kompensiert und erleichtert die Bikarbonatsekretion, die über den $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Antiporter bewerkstelligt wird. Das Chlorid rezirkuliert über CFTR- und Calcium-aktivierte Chlorid-Kanäle (Fong et al., 2003). Unter pathologischen Bedingungen, wenn es zur exzessiven Generierung von Sauerstoffradikalen und NO im Pankreas kommt, kann es durch Aktivierung von TALK-1 und -2 zur Zellschädigung und folglich zur Pankreatitis kommen (Chvanov et al., 2005, Enyedi und Czirjak, 2010).

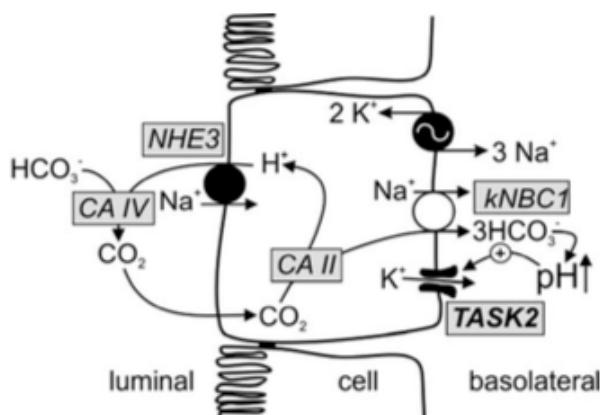


Abb. 1.9: Modell der TASK-2-Funktion im proximalen Tubulus der Niere (Warth et al., 2004). TASK-2 wird in der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszellen exprimiert. NaHCO_3^- -Resorption involviert in der apikalen Membran den Na^+/H^+ -Austauscher (NHE3). Über den elektrogenen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter (kNBC1) verlassen die Natrium- und Bikarbonationen die Zelle. Dabei kommt es zur Depolarisation der basolateralen Membran. Die im basolateralen Kompartiment nun erhöhte HCO_3^- -Konzentration erhöht den pH-Wert, wodurch die TASK-2-Kanäle aktiviert werden. Die durch die Na^+/K^+ -ATPase akkumulierten Kaliumionen werden über den TASK-2-Kanal recycelt, was zur Repolarisation der Membran führt und als Triebkraft für den NaHCO_3^- -Export benötigt wird. CA: Carboanhydrase

Neben dem exokrinen Pankreas wird der TALK-2-Kanal ebenfalls in der Leber, der Lunge, der Placenta, der Aorta und im Gehirn und Herz exprimiert (Decher et al., 2001, Girard et al., 2001, Kang und Kim, 2004). Wie Friedrich et. al. (2014) zeigten, wird der TALK-2-Kanal im Herz auch in den Purkinje-Zellen exprimiert und wurde

dort als Arrhythmie-Gen identifiziert. Durch eine Gain-of-function-Mutation komme es demnach zu einer verstärkten Repolarisation des Aktionspotentials, was eine Reentry-Arrhythmie begünstige. Des Weiteren resultiere durch eine Hyperpolarisation in den Purkinje-Fasern eine langsamere Leistungsfähigkeit.

TASK-1 und -3 sind unter anderem in den Glomerulosa-Zellen der Nebennierenrinde anzutreffen, wo sie eine Rolle in der Sekretion von Aldosteron spielen (Czirjak et al., 2000). Ein Knockout bewirkt einen primären Hyperaldosteronismus (Davies et al., 2008, Heitzmann et al., 2008). TASK-1 ist zudem für die Zonierung der Nebennierenrinde essentiell (Heitzmann et al., 2008).

Eine weitere pathophysiologische Bedeutung hat TASK-1 bezüglich seiner Lokalisation im Herzvorhof. Es wird vermutet, dass Loss-of-function-Mutationen im TASK-1 zu Vorhofflimmern führen (Liang et al., 2014)

Eine wesentliche pathophysiologische Bedeutung des TWIK-1 liegt in der Erzeugung von Herzrhythmusstörungen bei Hypokaliämie (Chen et al., 2014). Zu Grunde liegt das Phänomen der „Dynamischen Ionenselektivität“. Bei hypokaliämischen Bedingungen verändert sich der Kanal in Herzmuskelzellen von einer strikten Kaliumionen-Selektivität zu einem Natriumionen-permeablen Zustand, wodurch es zur paradoxen Depolarisation der Herzmuskelzellen kommt.

Über die Rolle des TRESK-Kanals ist bekannt, dass er unter anderem in DRG exprimiert wird und dort an der Nozizeption mitwirkt (Tulleuda et al., 2011). Des Weiteren soll ein Zusammenhang zur Migräne bestehen (Lafreniere et al., 2010).

K2P-Kanäle beeinflussen die Zellerregung und sind in der normalen Entwicklung und Funktion vieler Gewebe inklusive Herz, Gehirn, Nebenniere, Niere und Pankreas beteiligt. Die Forschung auf dem Gebiet der K2P-Kanäle spielt somit im Hinblick auf ein besseres Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie des menschlichen Körpers eine große Rolle. Auch die therapeutische Regulation von K2P-Kanälen durch Pharmaka ist potentiell von großem Interesse (Feliciangeli et al., 2014).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Regulation verschiedener K₂P-Kanäle durch Pharmaka und Membranlipide näher untersucht werden.

Für verschiedene K₂P-Kanäle sind bereits Pharmaka beschrieben worden. Durch die weitere Untersuchung der pharmakologischen Beeinflussung von K₂P-Kanälen und das Finden neuer Aktivatoren soll die zukünftige Erforschung dieser Kanäle erleichtert werden. Zudem sollen neue Erkenntnisse im Regulations- und Gatingmechanismus dieser Kanäle gewonnen werden.

Des Weiteren wird in dieser Arbeit der Einfluss von physiologisch vorkommenden Membranlipiden auf K₂P-Kanäle näher untersucht.

Während die Bedeutung der Phospholipide und langkettigen Acyl-CoA für die K_{iR}-Kanälen bereits beschrieben wurde, ist die Regulation vor allem letzterer an K₂P-Kanälen gänzlich unbekannt. Die bedeutsame Rolle der Acyl-CoA im Intermediärstoffwechsel macht gerade diese Molekülklasse zu einem sehr interessanten Zielobjekt bezüglich der Regulation von Ionenkanälen.

2. Material und Methoden

2.1 cRNA-Synthese

Für die RNA-Synthese musste zunächst die Plasmid-DNA gewonnen werden. Dafür wurden kompetente E. coli k12 DH5α mit dem Ionenkanal tragenden Plasmid transformiert und bei 37 °C über Nacht auf Ampicillin-LB-Agar-Platten (LB-Medium Luria/Mille, Roth, Karlsruhe, Deutschland) kultiviert. Mit einer der entstandenen Kolonien wurde eine 100 ml Flüssigkultur angeimpft und über Nacht geschüttelt.

Nach Zentrifugieren und Ernten der Bakterien wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des Maxiprep Kit (GeneJET Plasmid Maxiprep Kit #K0491, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) isoliert.

Für die nun folgende eigentliche cRNA-Synthese, die hier für die Synthese von TALK-2-RNA beschrieben wird, wurde das Plasmid mit Hilfe des Restriktionsenzymes Mlul (ER0562, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) linearisiert, woraufhin dieser Vorgang mit der Gelelektrophorese kontrolliert wurde (Abb. 2.1a). Die linearisierte DNA wurde anschließend mittels eines Kits (Nucleo Spin Gel and PCR-Clean-Up REF74060950, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gereinigt.

Die *in vitro*-Transkription erfolgte mit dem Ambion mMessage mMachine SP6 Transcription Kit (CAT#AM1340, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Dabei synthetisierte die RNA-Polymerase RNA vom linearisierten DNA-Template.

Nach dieser Synthesereaktion wurde die DNA mit Hilfe einer DNase (Ambion) abgebaut.

Abschließend erfolgten eine Phenol/Chloroform-Extraktion (Roti Phenol/Chloroform A156.3, Roth, Karlsruhe, Deutschland) und eine Ethanol-Fällung der RNA.

Das Pellet wurde in 20 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt (Nanodrop). Über eine abschließende Agarose-Gelelektrophorese (Abb. 2.1b) wurde die Integrität überprüft und die RNA bis zur Injektion bei -20 °C aufbewahrt.

Tab. 2 führt alle verwendeten Ionenkanäle mit der dazugehörigen „GenBank“-Inventarisierungsnummer (Accession-Number) und dem verwendeten Expressionsvektor auf.

Ionenkanal-DNA	GenBank-Acc.-Nr.	Expressionsvektor	Resistenz
TALK-2	EU978944.1	pBF	Ampicillin
TALK-1	NM_032115	pExo	Ampicillin
TASK-2	AF084830	pSGEM	Ampicillin
TREK-1	NM_172042	pSGEM	Ampicillin
TREK-2	NM_138318	pSGEM	Ampicillin
TRAAK	AF247042.1	pSGEM	Ampicillin
TRESK	NM_181840.1	pBF	Ampicillin

Tab. 2 Auflistung der GenBank-Accession-Number (Inventarisierungsnummer), des verwendeten Expressionsvektors und dessen Resistenz-Gen für jede in dieser Arbeit verwendeten Ionenkanal-DNA.

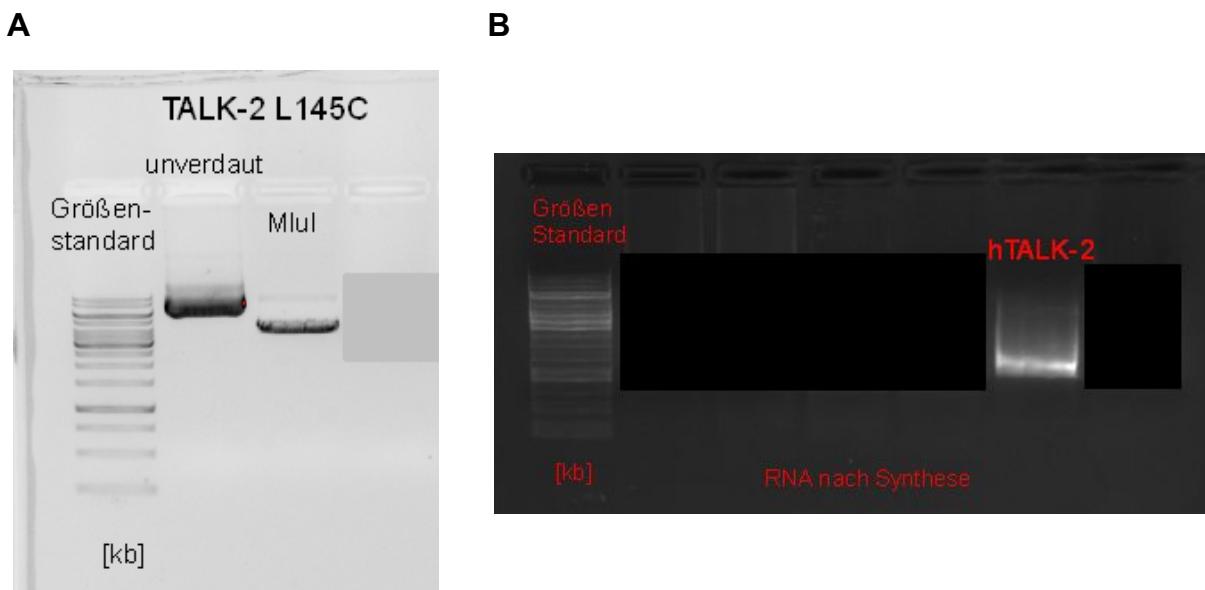


Abb. 2.1: Gelelektrophorese. (A) Gelelektrophorese am Beispiel der TALK-2 L145C DNA nach der Linearisierung der Plasmid-DNA mit Hilfe des Restriktionsenzym MluI (B) Gelelektrophorese am Beispiel der TALK-2 WT RNA im Anschluss an die RNA-Synthese

2.2 Mutagenese

Zur Herstellung von Mutanten wurde das Site-Directed Mutagenesis Kit (E05525, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) verwendet, bei dem das Plasmid mit der eingebauten WT-DNA mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert wurde, wobei die Primerpaare die gewünschte Mutation enthielten. Nach dieser PCR-Reaktion wurde die Matrize, eine methylierte doppelsträngige DNA, durch Zugabe der Restriktions-

endonuklease DpnI (ER1702, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) geschnitten und zerstört. Die verbleibenden Plasmide mit der Mutation wurden in Bakterien transformiert. Aus den entstandenen Kolonien wurden Plasmide isoliert und per Sequenzierung auf das Vorhandensein der richtigen Mutation überprüft. Die in dieser Arbeit untersuchten Mutanten wurden durch Dr. Hariolf Fritzenschaft und Dr. Marianne Musinszki in der Baukowitz-Arbeitsgruppe generiert.

2.3 Oozytenpräparation

Für die Messungen wurden Oozyten von adulten *Xenopus laevis* verwendet. Die Frösche wurden vor der Operation für zirka 10 Minuten in Tricaine betäubt und dann auf Eis gelegt. Es folgte die Entnahme der Oozyten, die anschließend kurzzeitig in OR2-Lösung aufbewahrt wurden (siehe Kap. 2.6). Die Oozytensuspension wurde daraufhin auf die Collagenase Typ 2 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) gegeben, manuell vereinzelt, defollikuliert und bis zur Injektion mit cRNA in ND96-Lösung (siehe Kap. 2.6) bei 17 °C im Brutschrank gelagert.

Jeder Frosch wurde höchstens vier Mal verwendet, wobei zwischen zwei Operationen ein Zeitraum von mindestens zwölf Wochen bestand.

2.4 Injektion von cRNA und Expression

Zwischen fünf und 30 Stunden nach der Präparation wurden Oozyten vom Reifestadium IV nach Dumont (Dumont, 1972) mit cRNA injiziert. Die Pipetten (GB200-8P, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) für die Injektion wurden mittels eines Mikropipettenpullers (Model P-97 und Model P-1000, Sutter Instruments Co., USA) ausgezogen und zirka 50 nl cRNA mit Hilfe der Pipette injiziert.

Die Aufbewahrung der Oozyten erfolgte bis zu den Patch-Clamp-Experimenten auf zuvor über einen Sterilfilter mit Testlösung (siehe Kap. 2.6) befüllten TC-Zellkulturplatten (24 Well, Standard, F, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), die im Brutschrank bei 17 °C gelagert wurden und in der sich pro Well nur eine Oozyte befand.

Die Experimente der Elektrophysiologie begannen zwei bis sechs Tage nach Injektion. In dieser Zeit erfolgte die Inkubation, in der die Proteine exprimiert werden konnten.

Direkt vor Beginn der Experimente wurde die jeweilige Oozyte in Badlösung (siehe Kap. 2.6) gelegt und manuell von ihrer Vitellinmembran befreit, wodurch ein freier Zugang zur Zellmembran erst ermöglicht wurde.

2.5 Elektrophysiologie

Der Messstand bestand aus einem Droplet, einer Art Kammer, gefüllt mit Badlösung (siehe Kap. 2.6), in die die Xenopus laevis-Oozyte, die als heterologes Expressionssystem diente, gelegt wurde. Unterhalb der Kammer befanden sich die Objektive des Mikroskops (Zeis Axiovert 40 CFL, Carl-Zeiss, Jena, Deutschland), der Boden des Droplets bestand aus einem Deckglas.

In die Kammer ragte ein Multibarrelsystem mit zehn Öffnungen, das als Applikationssystem diente. Es war an der Kammer befestigt, sodass Bewegungen der Kammer mittels eines Mikromanipulators der Firma Luigs-Neumann (SM1, Luigs-Neumann, Ratingen, Deutschland) auch Bewegungen des Multibarrelsystems relativ zum Patch ermöglichte.

Des Weiteren war ein Absaugsystem installiert, wodurch der Zulauf von Lösungen durch das Applikationssystem kontinuierlich abfließen konnte.

Für die Patch-Clamp-Experimente wurden Pipetten aus Borosilikatglas (GB200-8P, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) mittels eines Mikropipettenpullers (Model P-97 und Model P-1000, Sutter Instruments, USA) ausgezogen und anschließend mit einem heißen Draht poliert, sodass Pipettenwiderstände von 400 bis 650 kΩ erzeugt wurden, was einem Diameter in der Größenordnung von zirka 30 µm entspricht. Die Pipetten wurden für ein besseres Andocken der Pipettenöffnung an die Zellmembran in Paraffinöl getaucht und daraufhin mit Pipettenlösung (siehe Kap. 2.6) befüllt.

Der Pipettenhalter mit der darauf sitzenden Pipette wurde nun ebenfalls in die mit Badlösung gefüllte Kammer getaucht.

Die zwischen den beiden Elektroden (chloridierter Silberdraht in der Pipette und Referenzelektrode in der Kammer) gemessenen Spannungen und Ströme wurden mit einem EPC9-Verstärker (HEKA Elektronics, Lambrecht, Deutschland) aufgenommen und mit einem Bessel Filter mit 3kHz gefiltert. Das Haltepotential betrug -80 mV bei symmetrischen Kaliumkonzentrationen.

Die Patch-Clamp-Experimente wurden bei Raumtemperatur (zirka 20 °C) in der „inside-out“ Konfiguration (siehe Kap. 1.2) unter Voltage-Clamp-Bedingungen durchgeführt. Durch relatives Bewegen des Patches in die einzelnen Öffnungen des Multi-barrelsystems konnten pro Patch bis zu zehn verschiedene Substanzen auf die zytoplasmatische Seite der Zellmembran appliziert werden. Die Substanzen wirkten somit als intrazelluläre Lösungen. Sie waren in Badlösung gelöst.

2.6 Verwendete Lösungen und Chemikalien

OR2-Lösung:

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

pH 7,5 mit NaOH titriert

ND96-Lösung:

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

pH 7,5 mit NaOH titriert

Testlösung:

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

pH 7,4 mit NaOH titriert

Badlösung:

KCl	120 mM
HEPES	10 mM
EGTA	2 mM

pH 7,2 mit KOH/HCl titriert

Pipettenlösung:

KCl	120 mM
HEPES	10 mM
CaCl ₂	3,6 mM

pH 7,2 bzw. pH 9 mit KOH/HCl titriert

pH-Lösungen: siehe Badlösung, der pH-Wert ist entsprechend der pH-Lösung verändert

Rubidium-Lösung: siehe Badlösung, mit folgender Änderung: 120 mM RbCl anstelle von 120 mM KCl

Bezugsquellen der verwendeten Substanzen:

Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen, Deutschland:

2-APB, Dronabinol, TPA⁺, BSA, Polylysin, Heparin, Coenzym A, Ölsäure, Oleoyl-CoA.

Avanti Polar Lipids, USA / Otto Nordwald GmbH, Hamburg, Deutschland:

Alle in dieser Arbeit verwendeten Acyl-CoA (inklusive Oleoyl-CoA), PIP₂.

Von allen Substanzen mit Ausnahme von BSA, Polylysin und Heparin wurden Stammlösungen angelegt, anschließend bei -20 °C eingefroren und erst am jeweiligen Tag der Messung wieder aufgetaut und mit Badlösung auf die entsprechende Konzentration verdünnt.

2.7 Datenaufnahme und Datenauswertung

Die gemessenen Daten wurden mit Hilfe eines Dell Pentium E6700 Computers aufgenommen und ausgewertet. Die Datenaufnahme erfolgte mit den Programmen Pulse++ und EPC9-screen (HEKA Elektronics, Lambrecht, Deutschland). Für die weitere Verarbeitung der Daten wurden IGOR Pro Version 6.21 (WaveMetrics Inc., USA) und Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA) verwendet. Graphiken wurden mittels Microsoft Powerpoint 2010 (Microsoft, USA) und Canvas 8 (Deneba Systems, USA) erstellt und die Textverarbeitung mittels Microsoft Word 2010 (Microsoft, USA) durchgeführt.

Dosis-Wirkungs-Kurven wurden basierend auf der Hill-Gleichung gefittet, die auch der Berechnung der Inhibitionskonstanten (IC₅₀) beziehungsweise der mittleren effektiven Konzentration (EC₅₀) zugrunde liegt. Die Hill-Gleichung lautet:

$$I/I_{\max} = 1/(1+(X/IC_{50})^h) \text{ beziehungsweise } I/I_{\max} = 1/(1+(X/EC_{50})^h);$$

I_{max} (Maximalamplitude des Stroms), X (Konzentration der Substanz), I (Strom resultierend aus der Applikation von X), IC₅₀ (Inhibitionskonstante, benötigte Konzentration, um 50% des Ausgangstroms zu blockieren), EC₅₀ (mittlere effektiven Konzentration, Konzentration mit halbmaximalem Effekt), H (Hill-Koeffizient).

Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus mindestens drei Experimenten.

Die Formel zur Berechnung des arithmetischen Mittels (Mittelwert) lautet:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Die Formel zur Berechnung des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) lautet:

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

n = Stichprobengröße;

x_i = Einzelmesswert

\bar{x} = Mittelwert

s = Stichproben-Standardabweichung, wobei für s gilt:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

3. Ergebnisse

Dieses Kapitel gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil wurden die K2P-Kanäle am Beispiel vom TALK-2-Kanal auf die Regulation durch pH, Membranspannung und Pharmaka untersucht und im zweiten Teil wurde die Regulation von K2P-Kanälen durch endogene Membranlipide erforscht.

Alle Messungen wurden in inside-out-Patchen von Xenopus-Oozyten in symmetrischen Kaliumionenkonzentrationen (jeweils 120 mM) durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben betrug der pH-Wert sowohl in der Badlösung (intrazellulär) als auch in der Pipettenlösung (extrazellulär) 7,2.

Spannungsrampen wurden allesamt mit Pulsen von -80 bis +80 mV gefahren.

3.1 Regulation von K2P-Kanälen durch pH, Membranspannung und Pharmaka

3.1.1 Regulation von TALK-2 durch intra- und extrazellulären pH

Zu Beginn soll die Abhängigkeit des TALK-2-Kanals sowohl vom intra- als auch extrazellulären pH-Wert dargestellt werden.

Wie Abb. 3.1A zeigt, war der TALK-2-Kanal unter einem intra- und extrazellulären pH-Wert von 7,2 nahezu geschlossen. Diese Situation stellte unsere Standardbedingung/Ruhebedingung dar und war Ausgangspunkt für jede Messung.

Für viele K2P-Kanäle ist deren Aktivierung bei bestimmten intra- und extrazellulären pH-Werten bekannt. Aktiviert werden TREK-1 und TREK-2 durch sauren intrazellulären pH (Maingret et al., 1999, Lesage et al., 2000), TRAAK durch alkalischen intrazellulären pH (Kim et al., 2001a) und TASK-1 durch alkalischen extrazellulären pH (Duprat et al., 1997).

Die Kanäle der TALK-Familie, zu der TALK-1, TALK-2 und TASK-2 zählen, werden, wie der Name schon sagt, durch (extrazellulären) alkalischen pH aktiviert (Reyes et

al., 1998, Kang und Kim, 2004), TASK-2 zudem durch intrazellulären alkalischen pH (Niemeyer et al., 2010).

Für den TALK-2-Kanal ist bisher keine intrazelluläre pH-Abhängigkeit beschrieben worden.

Zunächst wird in Abb. 3.1B die hohe Leitfähigkeit des TALK-2 bei extrazellulärem alkalischen pH gezeigt. Daraufhin wurde die Abhängigkeit vom intrazellulären pH-Wert untersucht und in Form einer pH-abhängigen Wirkungskurve aufgenommen (Abb. 3.2). Ein Plateau wurde selbst bei pH 10 nicht erreicht. Wenn man den Strom auf denjenigen bei pH 10 normiert, erhält man einen EC₅₀-Wert von 9,58 ± 0,004.

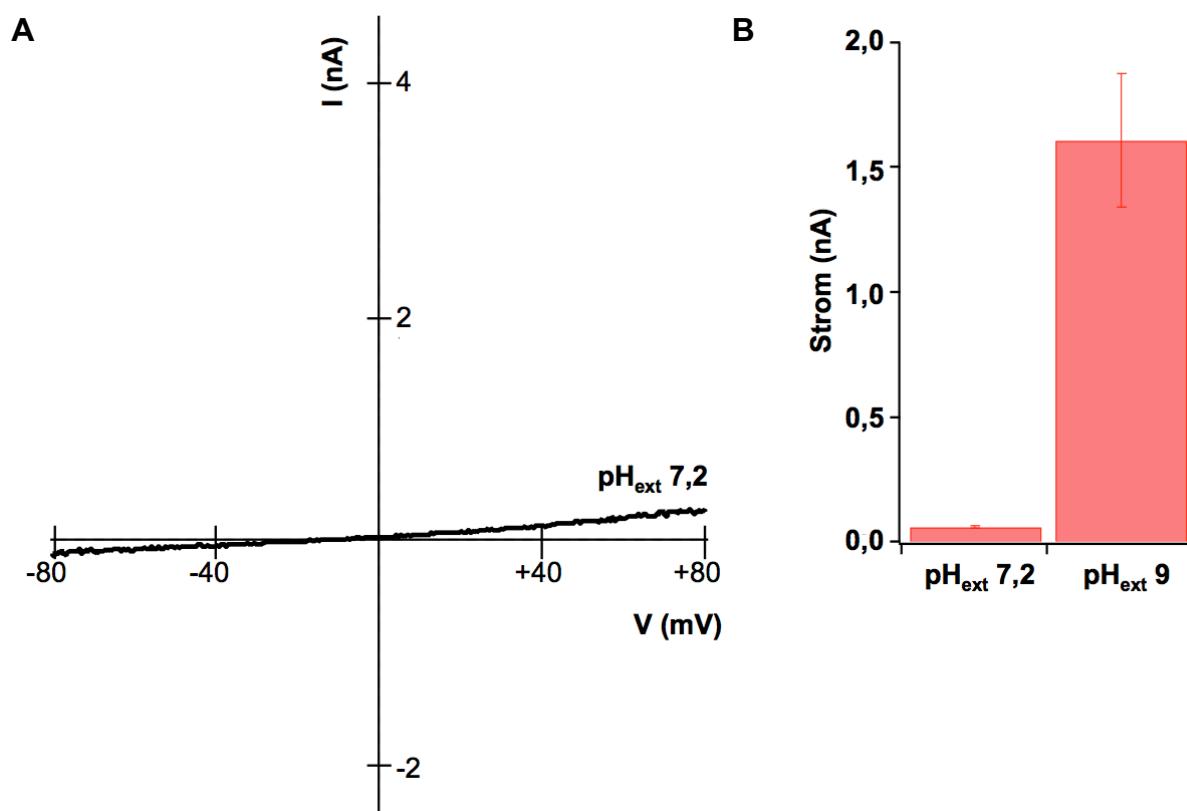


Abb. 3.1: Messung von TALK-2-Kanälen unter Standardbedingungen und Aktivierung durch alkalischen extrazellulären pH. (A) TALK-2, gemessen mit Hilfe einer Spannungsrampe bei intra- und extrazellulärem pH von jeweils 7,2 (Standardbedingungen). Der Kanal ist nahezu geschlossen. **(B)** Vergleich der Ströme von TALK-2 bei unterschiedlichen extrazellulären pH-Werten, gemessen bei +40 mV. Bemerke: Durch Verwendung einer extrazellulären Lösung (Pipettenlösung) mit pH 9 wird der TALK-2 stark aktiviert. pH_{ext} 7,2: 0,06 ± 0,01 nA (n=4); pH_{ext} 9: 1,61 ± 0,27 nA (n=4). Jeder Datenpunkt entspricht dem Durchschnittswert ± SEM.

Zusammenfassend kann man beim TALK-2 von einem sowohl extrazellulär als auch intrazellulär alkalisch aktivierte Kanal sprechen, wobei eine nennenswerte Aktivierung im intrazellulären Bereich erst bei sehr hohen (unphysiologischen) pH-Werten erfolgte.

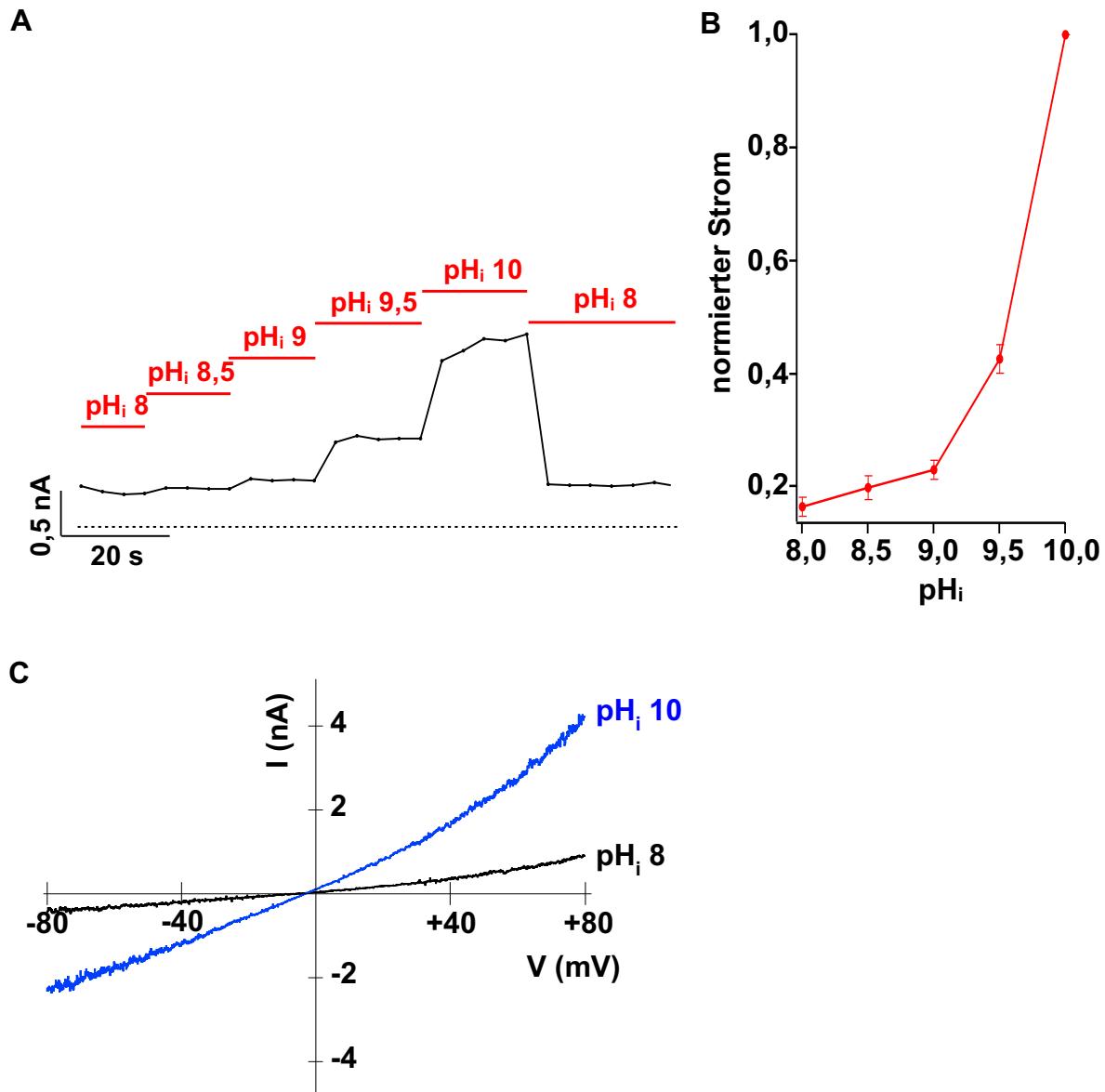


Abb. 3.2: Aktivierung von TALK-2-Kanälen durch alkalischen intrazellulären pH. (A) pH-abhängige Wirkungskurve mit intrazellulären pH_i Werten von 8 bis 10 in 0,5 pH-Schritten bei +40 mV. (B) pH-abhängige Wirkungskurve normiert auf den bei pH_i 10 aktivierten Strom. Ein Plateau wird in dieser pH-Spanne nicht erreicht. EC₅₀ = 9,58 ± 0,004 (n=4). Jeder Datenpunkt entspricht dem Durchschnittswert ± SEM. (C) Rampen zeigen die Aktivierung durch intrazellulär alkalischen pH-Wert (pH 10, blau) im Vergleich zu pH 8 (schwarz).

3.1.2 Aktivierung von TALK-2 durch Membranspannung und Rb^+

Wie Schewe et. al. (2016) zeigten, sind die meisten K2P-Mitglieder stark spannungsaktiviert. Abgesehen vom TWIK-1 zeigen alle anderen K2P-Kanäle eine Auswärtsrektifizierung.

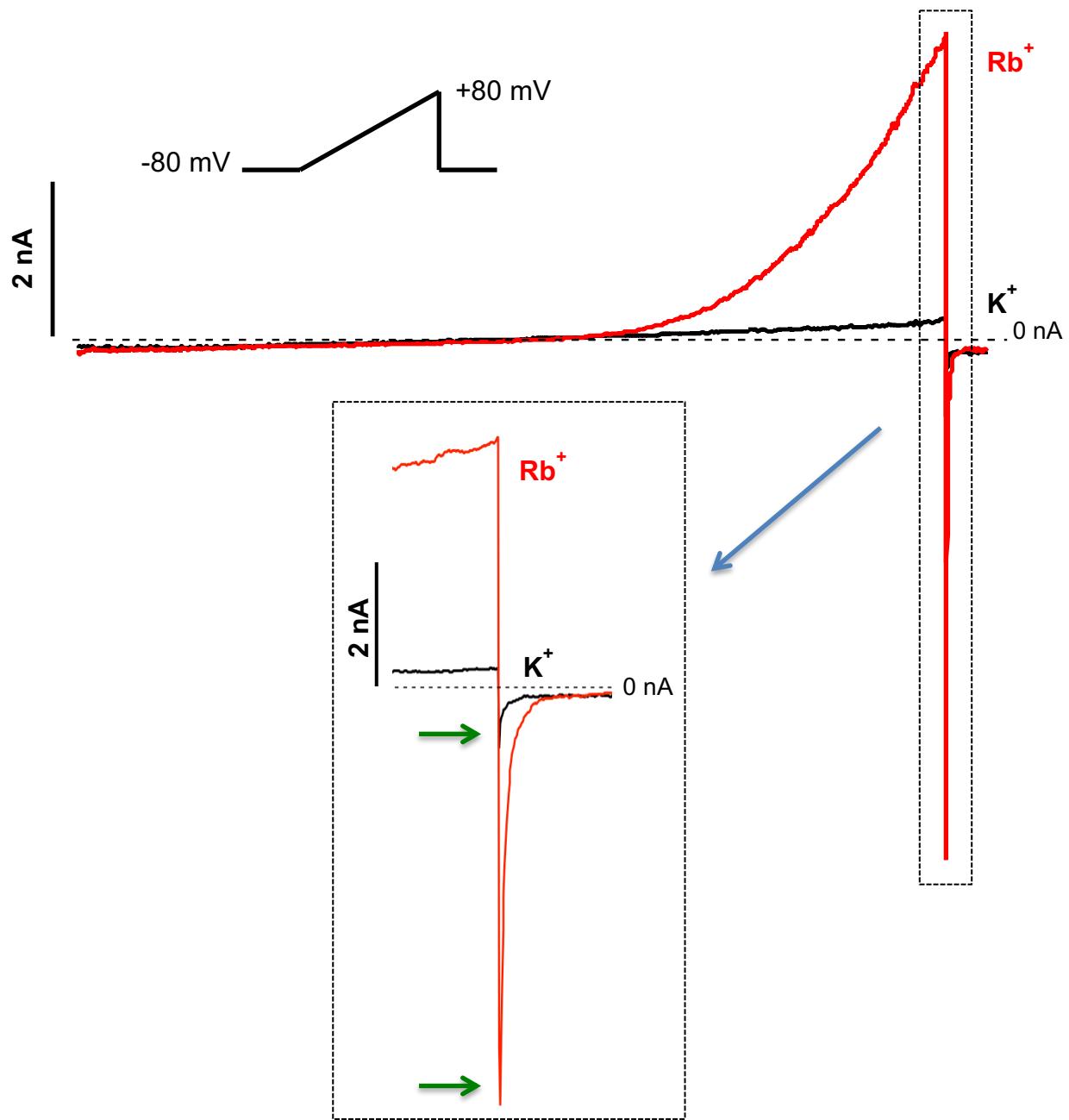


Abb. 3.3: Aktivierung von TALK-2-Kanälen durch Membranspannung und deren Verstärkung durch Ersetzen der intrazellulären Kaliumionen durch Rubidiumionen. Die Spannung wurde von -80 auf +80 mV depolarisiert und anschließend wieder direkt auf -80 mV hyperpolarisiert. Die grünen Pfeile im Einsatz kennzeichnen die Tail-Ströme. Bemerke: Durch Austausch der intrazellulären Kaliumionen (schwarz) durch Rubidiumionen (rot) wird die Spannungsaktivierung enorm verstärkt, was auch an der Zunahme der Tail-Ströme zu sehen ist.

Die leichte Aktivierung des TALK-2 durch Membranspannung ist in Abb. 3.3 zu sehen (schwarzer Graph). Diese Spannungsaktivierung konnte dramatisch verstärkt werden, wenn die intrazellulären Kaliumionen durch Rubidiumionen ersetzt wurden (roter Graph). Bemerkenswert ist der enorme Anstieg der sogenannten Tail-Ströme (Abb. 3.3 Kasten), die dadurch zustande kommen, dass im Zustand maximaler Depolarisation (+80 mV) auf -80 mV hyperpolarisiert wird und anfangs die Kanäle noch durch die Spannungsaktivierung offen sind. Dies zeigten auch Schewe et. al. (2016) für verschiedene K2P-Kanäle.

Schewe et. al. (2016) legten den Mechanismus der Spannungsaktivierung dar: Nachdem die Involvierung des Helix-Bundle-Crossing am Mechanismus der Spannungsaktivierung ausgeschlossen werden konnte, wurde gezeigt, dass der Selektivitätsfilter durch „Fühlen“ des elektrochemischen Gradienten für das Phänomen der Spannungsaktivierung verantwortlich ist.

Diese Spannungsregulation konnte ich auch für TALK-2 bestätigen. Wie in Kap. 1.5 näher erläutert wurde, durchlaufen die Ionen bei Durchtritt durch die Pore die vier Bindungsstellen S1 bis S4 des Selektivitätsfilters und werden durch Carbonylgruppen des Aminosäurerückgrats an S1 bis S3 beziehungsweise durch die Hydroxylgruppe der Threonine an S4 koordiniert (Doyle et al., 1998).

Für S4 ist weiterhin bekannt, dass das Threonin an Position 116 für die Koordination der Ionen und für die Ionenbesetzung in der Pore verantwortlich ist (Abb. 3.4B). Die Bedeutung dieses Threonins für die Spannungsaktivierung von TALK-2 wurde hier untersucht.

Durch Vergleich der Mutation T116C mit dem Wildtyp kann in Abb. 3.4A gezeigt werden, dass die Verstärkung der Spannungsaktivierung durch Rubidiumionen stark reduziert ist. Dies impliziert, dass auch im TALK-2 die Spannungsaktivierung ein ionenabhängiger Gating-Mechanismus im Selektivitätsfilter ist, wie bereits für andere K2P-Kanäle gezeigt wurde (Schewe et al., 2016).

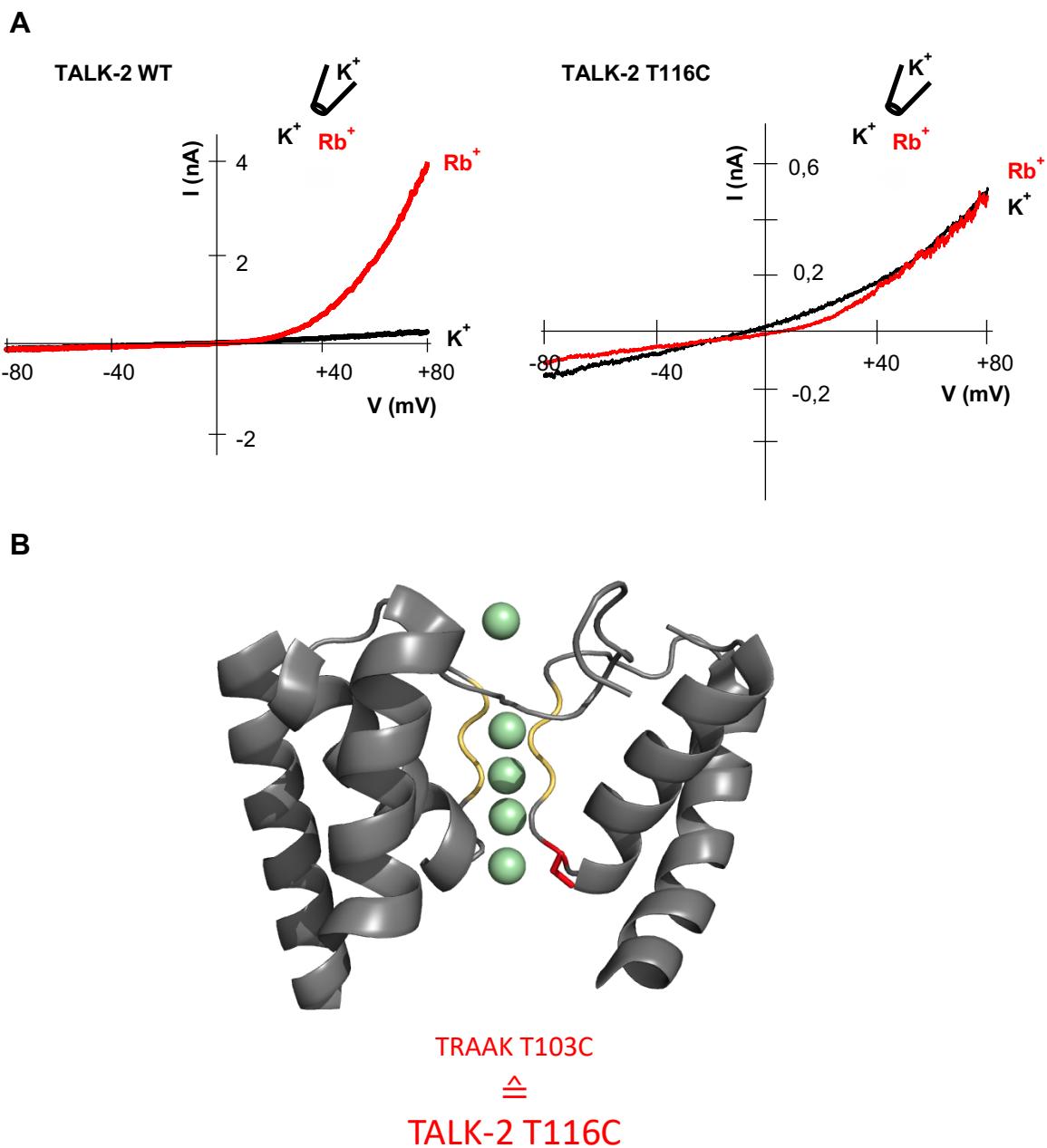


Abb. 3.4: Vergleich von TALK-2 WT und TALK-2 T116C. (A) Spannungsaktivierung von TALK-2 WT und TALK-2 T116C, gemessen für intrazelluläre Kaliumionen (schwarz) und Rubidiumionen (rot). Bemerke: Die Verstärkung der Spannungsaktivierung durch Rubidiumionen konnte durch die Mutation des Threonin (T116C) beseitigt werden. (B) Kristallstruktur vom TRAAK (nur eine Untereinheit, nach Brohawn et al. (2013)) mit der Region des Selektivitätsfilters inklusive des hochkonservierten GFG/GYG Motivs (gelb). Die grünen Kugeln repräsentieren Kaliumionen, koordiniert von oben nach unten in S0 bis S4. Die Cystein-Mutation T103C entspricht der T116C Mutation im TALK-2. Dieses Threonin koordiniert die Ionen an S4 und verändert die Ionenbesetzung in der Pore.

3.1.3 Aktivierung von TALK-2 durch Pharmaka

Aufgrund ihrer pathophysiologischen Relevanz (Kap. 1.7) stellen die K2P-Kanäle als Zielmoleküle für die Entwicklung neuer Pharmaka eine hohe Relevanz dar. Wie im Kapitel 1.6 erläutert, sind für die Mehrheit dieser Kaliumkanalklasse bereits Aktivatoren beschrieben worden.

Für den TALK-2 ist allerdings bisher kein pharmakologischer Aktivator bekannt. Der TALK-2 wurde deshalb in dieser Arbeit einem Screening mit einer Reihe pharmakologischer Substanzen unterzogen.

Beltran et. al. (2013) konnte zeigen, dass das Pharmakon 2-APB (2-Aminoethoxydiphenylborat, Struktur siehe Abb. 3.5D) TREK-1, TREK-2 und TRAAK aktiviert.

In Abb. 3.5A ist die Wirkung von 2-APB auf TALK-2-Kanäle gezeigt. Steigende 2-APB-Konzentrationen führten zu einer halbmaximalen Aktivierung im höheren mikromolaren Bereich.

Des Weiteren zeigte das Strukturhomologon Dofenin, ein Anticholinergikum mit neuromotrop-muskulotroper Wirkung (Struktur siehe Abb. 3.5D), eine Aktivierung mit ähnlicher Kinetik wie 2-APB (siehe Abb. 3.5B).

Wie Abb. 3.5C zu entnehmen ist, erfolgte die Aktivierung sowohl von 2-APB als auch vom Spasmolytikum Dofenin im Gegensatz zur Rubidiumaktivierung spannungsunabhängig.

Somit konnten in dieser Arbeit erstmals aktivierend wirkende pharmakologische Moleküle für den TALK-2-Kanal gefunden werden. Zudem kann geschlussfolgert werden, dass die stimulierende Wirkung von 2-APB unter den K2P-Kanälen nicht nur die TREK-Subfamilie (TREK-1, TREK-2, TRAAK) betrifft.

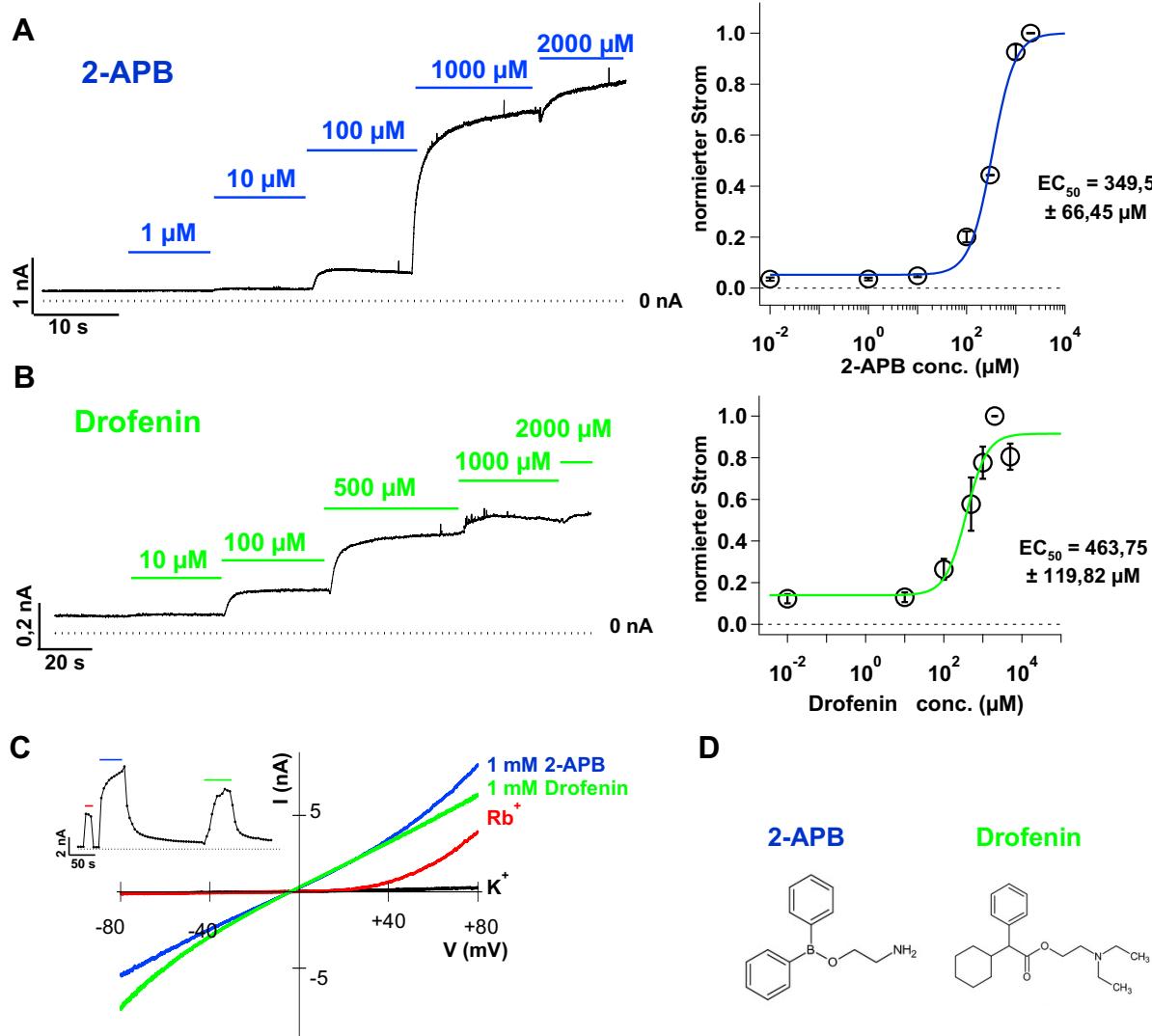


Abb. 3.5: Neue pharmakologische Aktivatoren des TALK-2. (A) und (B) TALK-2-Kanäle, gemessen bei +40 mV, wurden mit angegeben Konzentrationen von 2-APB (2-Aminoethoxydiphenylborate) und Drofenin stimuliert. Entsprechende Dosis-Wirkungskurven, gefittet mit der Hill-Gleichung, sind rechts zu sehen (2-APB: EC₅₀ = 349,5 ± 66,45 μM; Hill-Koeffizient = 1,89 ± 0,3 (n=9); Drofenin: EC₅₀ = 463,75 ± 119,82 μM; Hill-Koeffizient = 1,62 ± 0,94 (n=5)). Jeder Datenpunkt entspricht dem Durchschnittswert ± SEM. (C) TALK-2-Kanäle, gemessen mit einem Rampenprotokoll, wurden aktiviert mit 1 mM 2-APB beziehungsweise Drofenin und durch Ersetzen der intrazellulären Kaliumionen durch Rubidiumionen. Der Einsatz zeigt die Aktivierung durch Rubidium (rot), 1 mM 2-APB (blau) und 1 mM Drofenin (grün) bei +80 mV. Beide Pharmaka aktivierten TALK-2-Kanäle bei höheren mikromolaren Konzentrationen und die Aktivierung war im Gegensatz zur Rubidiumaktivierung spannungsunabhängig. (D) Chemische Strukturen von 2-APB und Drofenin.

3.1.4 Unterschiede in der TPA⁺-Inhibition für verschiedene Aktivierungsmechanismen

Quartäre Ammoniumionen werden in der Elektrophysiologie seit Jahrzehnten als nützliche „Hilfsmittel“ zur Erforschung von Kaliumkanälen eingesetzt. Sie bestehen aus einem zentralen positiv geladenen Stickstoff-Atom, mit dem vier Alkyl-Reste einfach verbunden sind. Diese Moleküle sind schon langjährig als Blocker der meisten Kaliumkanäle bekannt (Armstrong, 1966). Insbesondere hat sich der intrazelluläre Block als äußerst nützlich erwiesen, wenn es darum ging, die innere Porenstruktur oder die Gating-Mechanismen von bestimmten Kaliumkanälen näher zu beschreiben (Armstrong, 1971, Baukowitz und Yellen, 1996, Holmgren et al., 1997, Wilkens und Aldrich, 2006).

Seit ihrer Entdeckung wurden die K2P-Kanäle in der Literatur stets als insensitiv bezüglich der klassischen Kaliumkanalblocker 4-Aminopyridin (4-AP), Caesium und auch Tetraethylammonium (TEA⁺) beschrieben (Fink et al., 1996, Fink et al., 1998, Lotshaw, 2007). Diese Insensitivität bezieht sich allerdings auf die Wirkung von extrazellulär. Mit Ausnahme von Cotten et al. (2004) wurden keine quartären Ammoniumionen von intrazellulär an K2P-Kanälen untersucht, bis Piechotta et al. 2011 den Block von TEA⁺ und längerkettenigen Alkylrest-Derivaten (unter anderem TPA⁺) zeigten und daraus neue Erkenntnisse der Porenstruktur und des Gatings von K2P-Kanälen ableiten konnten. Ferner konnte durch Mutagenese die Bindungsstelle für TPA⁺ im TREK-1 gefunden werden. Sie liegt in der Kavität der Pore direkt unterhalb des Selektivitätsfilters, resultierend in einer Abnahme der Affinität des TPA⁺-Blocks bei Mutation der Threonine am hochkonservierten GYG-Motiv (TXGYG).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die TPA⁺-Inhibierungspotenz von der Art der Aktivierung abhängig ist.

Die Abb. 3.6 zeigt, dass beim TALK-2 unter Aktivierung durch 1 mM 2-APB ein fast vollständiger Block ($94,4 \pm 1,7\%$) bei Zugabe von 1 mM TPA⁺ erreicht wurde, während es unter Rubidiumaktivierung ($37,9 \pm 1,5\%$) und Aktivierung durch extrazellulären alkalischen pH ($11,5 \pm 4,8\%$) nur zu einem schwachen Block kam (Abb. 3.6 A+B, linke Spalte).

Im Gegensatz dazu fand beim TREK-1, unabhängig vom Aktivator, ein fast kompletter Block bei 1 mM TPA⁺-Zugabe statt ($98,8 \pm 0,2\%$ bei 1 mM 2-APB; $93,4 \pm 0,5\%$ bei Rb⁺; $95,5 \pm 0,7\%$ bei intrazellulärem pH 5; Abb. 3.6 A+B, rechte Spalte).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass TALK-2-Kanäle, die durch Rubidiumionen oder pH aktiviert werden, eine deutlich geringere TPA⁺-Inhibition zeigen als 2-APB-aktivierte Kanäle. Aufgrund des Wissens um die TPA⁺-Bindungsstelle wird vermutet, dass Unterschiede in der Porenstruktur des mit Rubidiumionen- oder pH-aktivierten TALK-2 im Vergleich zum 2-APB-aktivierten Kanal bestehen. Diese Unterschiede bestehen beim TREK-1 nicht (Abb. 3.6).

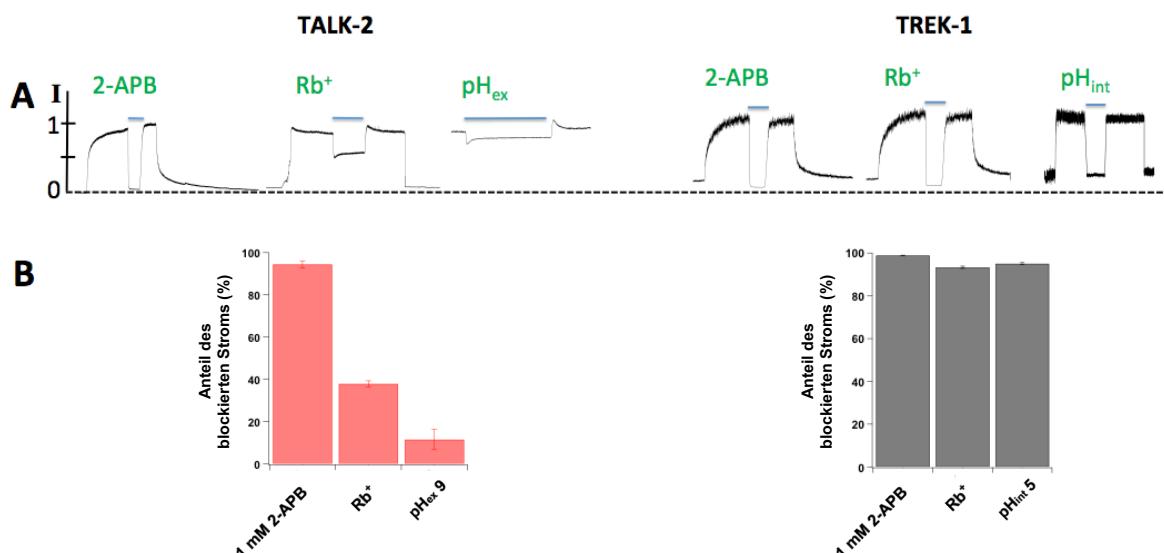


Abb. 3.6: TPA⁺-Sensitivität des TALK-2 hängt vom Aktivierungsmechanismus ab. TALK-2 (linke Spalte) im Vergleich zum TREK-1 (rechte Spalte). (A) Messungen bei +40 mV, TALK-2 beziehungsweise TREK-1 wurden mit 1 mM 2-APB, Rb⁺ und pH (extrazellulärer pH 9 bei TALK-2; intrazellulärer pH 5 bei TREK-1) aktiviert und jeweils mit 1 mM TPA⁺ (blaue Balken) blockiert. Die Ströme sind auf die maximale Aktivierung für jeden Aktivator normiert. (B) Balkendiagramme zeigen den Anteil des blockierten Stroms bei Zugabe von 1 mM TPA⁺ für jeden Aktivator. Für TALK-2: 1 mM 2-APB: $94,4 \pm 1,7\%$, n=8; Rb⁺: $37,9 \pm 1,5\%$, n=10; pH_{ex}: $11,5 \pm 4,8\%$, n=4; für TREK-1: 1 mM 2-APB: $98,8 \pm 0,2\%$, n=4; Rb⁺: $93,4 \pm 0,5\%$, n=3, pH_{int}: $94,5 \pm 0,1\%$, n=5. Jeder Datenpunkt entspricht dem Durchschnittswert \pm SEM.

3.2 Regulation von K2P-Kanälen durch Membranlipide

Nachdem im vorherigen Kapitel vor allem mechanistische und pharmakologische Überlegungen der K2P-Kanäle besprochen wurden, wird das folgende Kapitel die endogene Regulation von K2P-Kanälen durch physiologisch vorkommende Membranlipide behandeln.

3.2.1 Regulation von TREK-1 durch Membranlipide

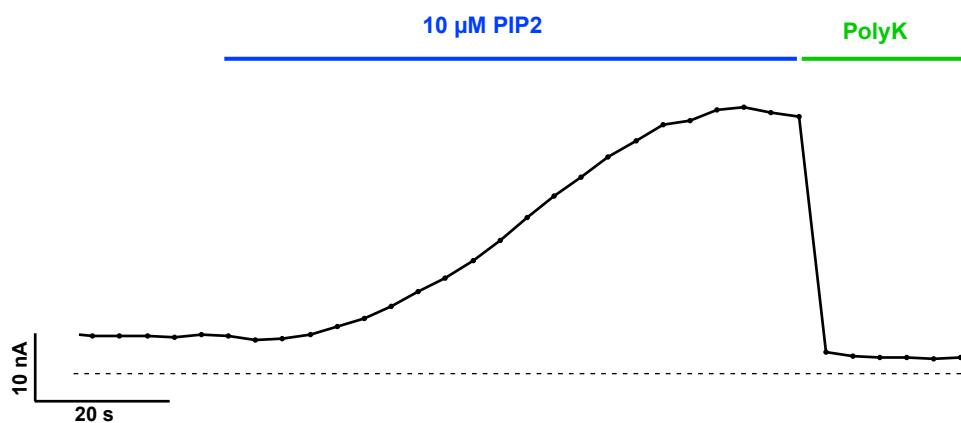
Auf der Suche nach neuen Erkenntnissen bezüglich der Regulation von K2P-Kanälen durch Membranlipide wird mit dem TREK-1 begonnen, dem bislang am gründlichsten untersuchten K2P-Kanal.

Unter den Membranlipiden stellen die Phospholipide die wichtigste Gruppe dar. Sie sind amphiphile Substanzen und wurden bereits im Kapitel 1.7 vorgestellt. Das zu dieser Gruppe gehörende PIP₂, das neben seinen allgemeinen regulatorischen Aufgaben eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion spielt (Hilgemann et al., 2001, Yamamoto et al., 2001), wurde bereits an K2P-Kanälen untersucht. Es ist aus Diacylglycerin, das über eine Phosphodiesterbindung mit Inositol-4,5-bisphosphat verbunden ist, aufgebaut.

Es konnte gezeigt werden, dass PIP₂ und auch andere Phospholipide TREK-1 stimulieren (Chemin et al., 2005, Lopes et al., 2005, Honore, 2007). Die PIP₂-Wirkung konnte auf elektrostatische Interaktionen zwischen dem negativ geladenen PIP₂, bei dem die Phosphatgruppe am C3-Atom entscheidend für die Wirkung ist, und dem positiv geladenen proximalen C-Terminus des TREK-1 (siehe Kap. 4.2) zurückgeführt werden (Chemin et al., 2005). Wie Chemin et al. des Weiteren zeigten, kann diese elektrostatische Interaktion durch das kationische Molekül Polylysin (PolyK) gehemmt werden, das insbesondere an stark negativ geladene Phospholipide wie PIP₂ bindet.

Abb. 3.7A zeigt die Aktivierung von TREK-1 durch 10 µM PIP₂ und die anschließende Inhibition durch 100 µg/ml PolyK. Die Polylysin-Inhibition konnte wiederum durch 100 µg/ml Heparin aufgehoben werden, das am Polylysin bindet und dieses dadurch wieder aus der Interaktion mit PIP₂ löst (Chemin et al., 2005) (Abb. 3.7B).

A



B

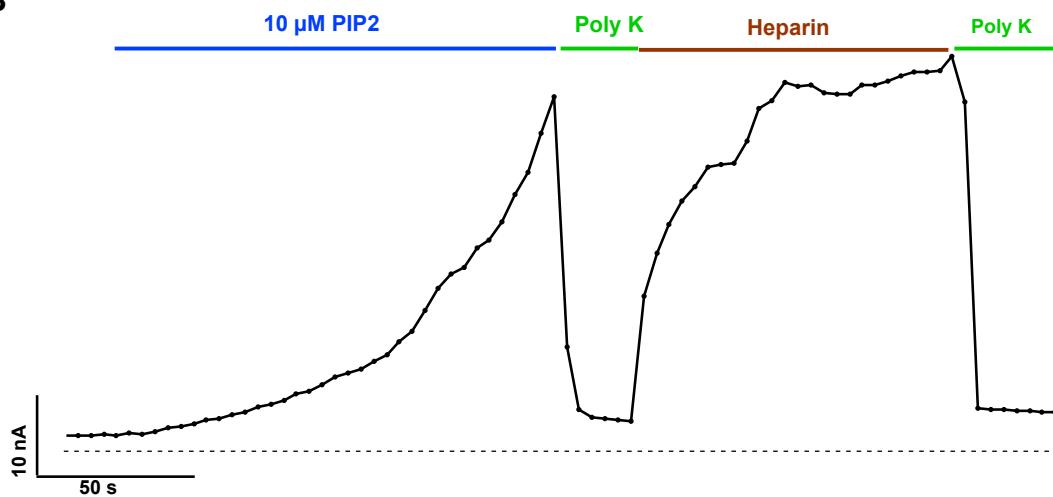


Abb. 3.7: Regulation von TREK-1 durch PIP₂ und Polylysin. (A) TREK-1, gemessen bei +80 mV, aktiviert mit 10 µM PIP₂ und anschließende Inhibition durch Polylysin (PolyK, 100 µg/ml). PolyK bindet PIP₂ und hebt dadurch dessen Wirkung auf. (B) Nach 10 µM PIP₂- und 100 µg/ml PolyK-Gabe konnte durch 100 µg/ml Heparin die inhibierende Wirkung von PolyK rückgängig gemacht werden.

Phospholipide spielen auch in der Regulation der K_{ir}-Kanäle eine wichtige Rolle, die allesamt durch PIP₂ stimuliert werden (Baukowitz et al., 1998, Huang et al., 1998, Lopes et al., 2002).

Interessanterweise wird der zu den K_{ir}-Kanälen zählende K_{ATP}-Kanal neben PIP₂ (Fan und Makielski, 1997, Baukowitz et al., 1998, Shyng et al., 2000) auch durch Acyl-CoA (LC-CoA) aktiviert (Larsson et al., 1996, Branstrom et al., 1998, Gribble et al., 1998, Liu et al., 2001, Rohacs et al., 2003), während letzteres auf die übrigen K_{ir}-Kanäle eine inhibitorische Wirkung aufweist (Rapedius et al., 2005).

Bezüglich der K2P-Kanäle ist jedoch bisher keine Regulation durch LC-CoA beschrieben worden, weshalb im Folgenden die Wirkung von LC-CoA auf TREK-1-Kanäle untersucht wurde. Hierbei wurde zunächst Oleoyl-CoA eingesetzt.

Abb. 3.8A zeigt das Ergebnis der 10 µM Oleoyl-CoA-Applikation im inside-out Patch beim TREK-1. Man sieht eine deutliche Aktivierung, die nach mehreren Minuten ein Plateau erreicht. Dieser Zeitverlauf ist durch den Einwasch des Lipids bedingt und kennzeichnend für diese Molekülklasse.

Als nützliches Hilfsmittel hat sich Rinderalbumin (bovine serum albumin, BSA) erwiesen (Rapedius et al., 2005), das Oleoyl-CoA und andere LC-CoA bindet und dadurch vom Membran-Patch entfernt. Dies ermöglicht Experimente, in denen mehrere Substanzen in einem Patch untersucht werden sollen, ohne dass noch Reste von LC-CoA im Patch vorhanden sind. In Abb. 3.8A ist der Effekt von 5 mg/ml BSA zu sehen: Innerhalb weniger Sekunden ist der Effekt von Oleoyl-CoA beseitigt worden.

Abb. 3.8B stellt den Verlauf einer Rampe und den direkten Vergleich der Aktivierung von 10 µM Oleoyl-CoA mit der in Kap. 3.1.2 beschriebenen Rubidiumaktivierung dar.

3.2.2 Regulation von TALK-2 durch Membranlipide

Nachdem im vorherigen Kapitel die Aktivierung des TREK-1 sowohl durch PIP₂ als auch durch Oleoyl-CoA gezeigt werden konnte, sollte nun der TALK-2 auf diese Substanzen untersucht werden.

In Kapitel 3.1 wurden die ersten den TALK-2-Kanal von intrazellulär aktivierenden Substanzen überhaupt aufgezeigt. Nun sollte der Kanal auf die physiologisch vorkommenden Lipide PIP₂ und Oleoyl-CoA untersucht werden.

Es ist festzustellen, dass TALK-2 durch 10 µM Oleoyl-CoA äußerst stark aktiviert wurde, während für PIP₂ nur eine sehr geringe Aktivierung auszumachen war (Abb. 3.9).

Im Vergleich zu den in Kap. 3.1 beschriebenen Aktivatoren 2-APB, Dofenin und Rubidiumionen, deren Aktivierung in der Größenordnung der in Abb. 3.9 dargestellten Rubidiumaktivierung lag, war die Oleoyl-CoA-Aktivierung um ein Vielfaches größer, zumal nur eine niedrige mikromolare Konzentration eingesetzt wurde.

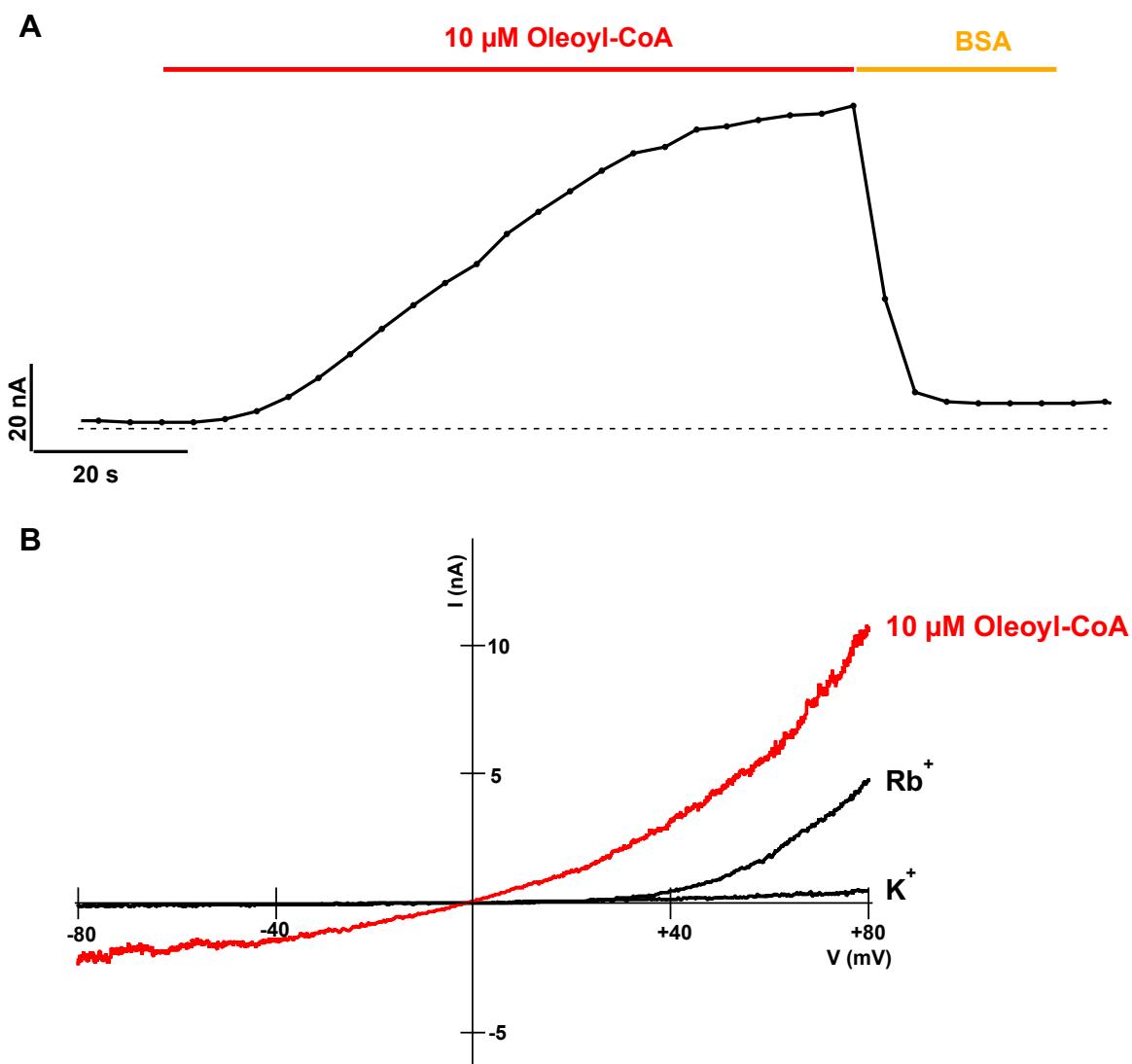


Abb. 3.8: Regulation von TREK-1 durch Oleoyl-CoA. (A) TREK-1, gemessen bei +80 mV, aktiviert mit 10 μM Oleoyl-CoA und anschließende Inhibition durch 5 mg/ml BSA (bovine serum albumin). (B) Rampenprotokoll, Vergleich von TREK-1 unter Ausgangsbedingung (K^+), Aktivierung durch Rubidium (Rb^+) und Aktivierung durch 10 μM Oleoyl-CoA (rot).

Der Vergleich der Rubidium- und Oleoyl-CoA-Aktivierung ist zudem anhand eines Rampenprotokolls in Abb. 3.10 zu sehen.

Bisher wurden stets 10 μM Oleoyl-CoA eingesetzt. Abb. 3.11 und 3.12 zeigen die Aktivierung in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration (0,1 μM bis 30 μM).

Somit können erstmals endogene von intrazellulär wirksame physiologisch vorkommende Aktivatoren des TALK-2 beschrieben werden. Oleoyl-CoA stellt sich als äußerst potenter Aktivator dar, der sogar im nanomolaren Bereich nach mehreren Mi-

nuten eine wenn auch geringe Wirkung erzielt. PIP_2 aktiviert zwar den Kanal, jedoch nur in einem sehr geringen Maße.

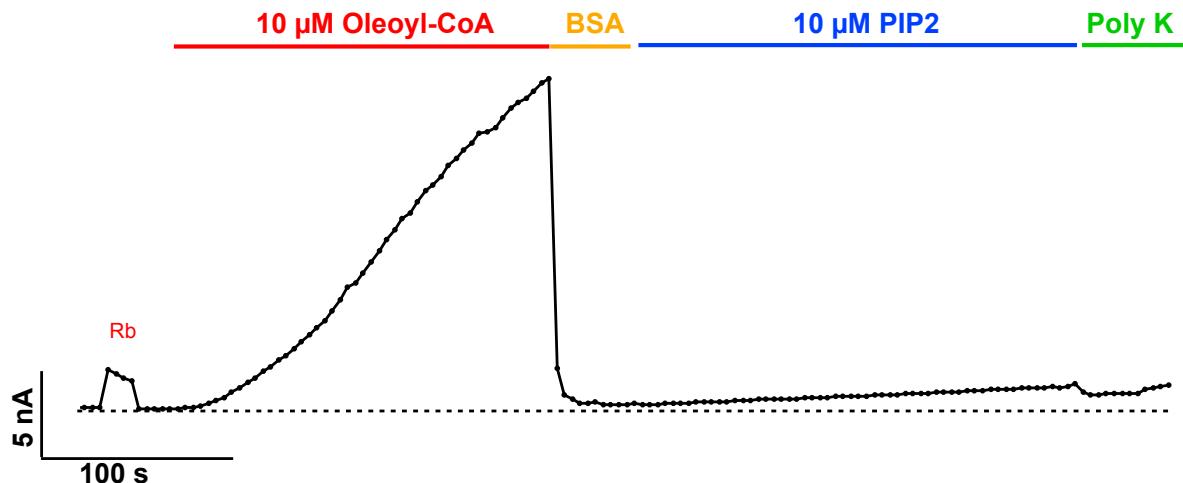
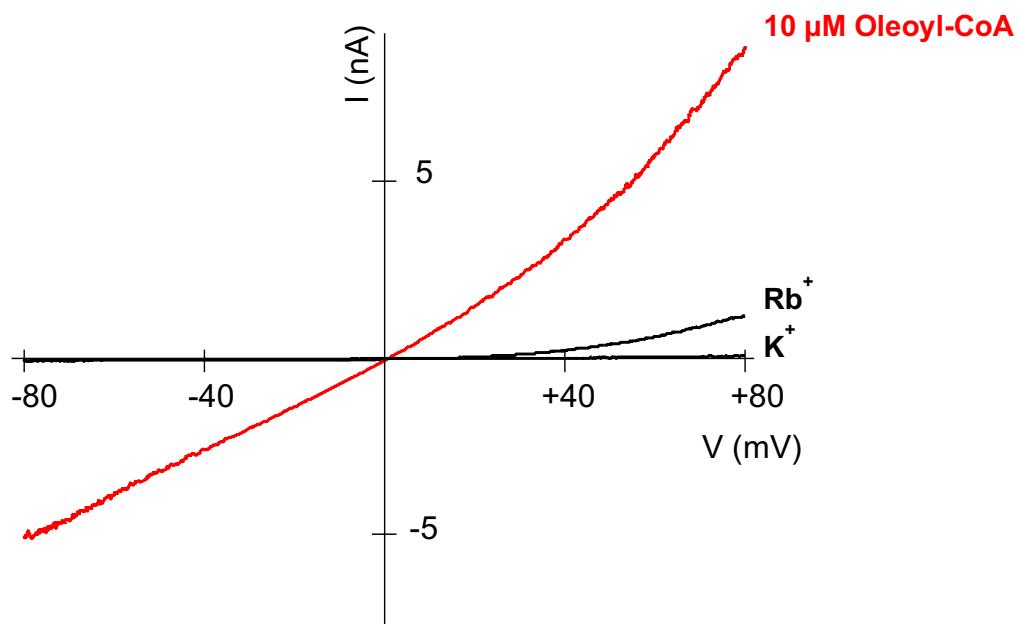


Abb. 3.9: Regulation von TALK-2 durch Oleoyl-CoA und PIP_2 . TALK-2, gemessen bei +80 mV, zunächst als Vergleich mit Rubidiumionen aktiviert und anschließend mit 10 μM Oleoyl-CoA und nach Auswaschung durch 5 mg/ml BSA mit 10 μM PIP_2 aktiviert. Abschließende Applikation von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PolyK.



3.10: Aktivierung von TALK-2 durch Oleoyl-CoA im Vergleich zur Ausgangssituation und zur Rubidiumaktivierung im Rampenprotokoll. Vergleich von TALK-2 unter Ausgangsbedingung (K^+), Aktivierung durch Rubidiumionen (Rb^+) und Aktivierung durch 10 μM Oleoyl-CoA (rot).

3. Ergebnisse

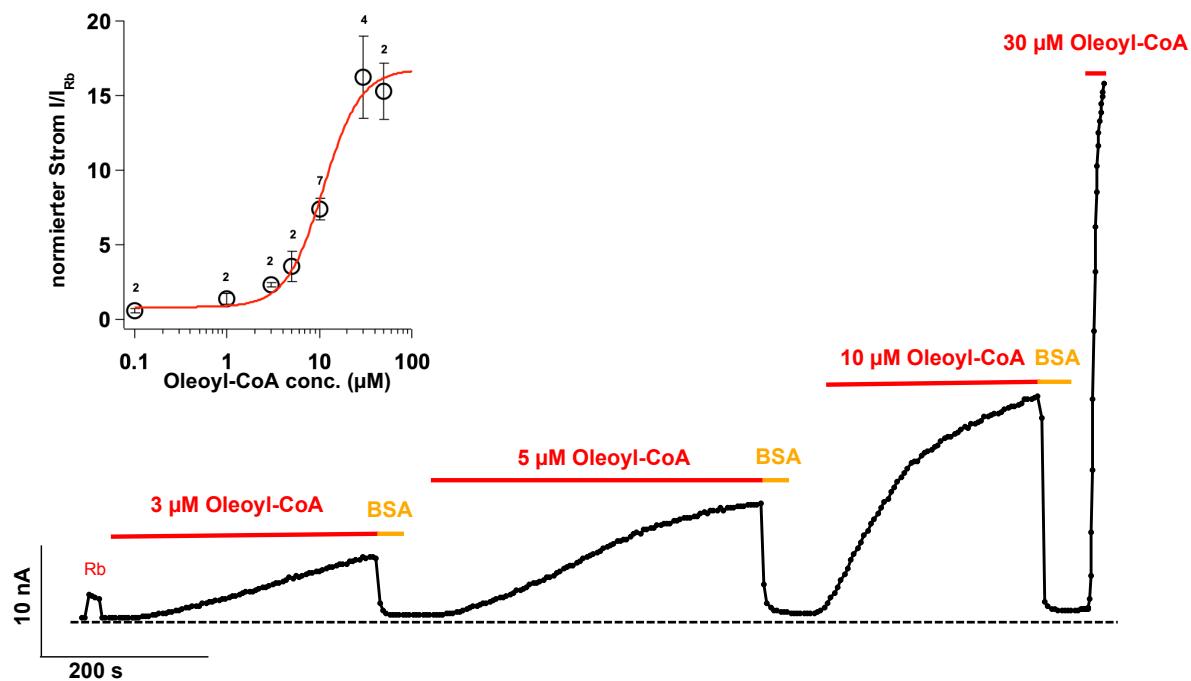


Abb. 3.11: Dosis-Wirkungs-Beziehung von Oleoyl-CoA am TALK-2. Applikation von 3 μM , 5 μM , 10 μM und 30 μM Oleoyl-CoA und jeweils Auswaschung mit 5 mg/ml BSA, gemessen bei +80 mV. Zu Beginn Aktivierung durch Rubidiumionen zum Vergleich. Der Einsatz zeigt die Dosis-Wirkungskurve von Oleoyl-CoA, dessen Konzentration logarithmisch aufgetragen ist ($EC_{50} \approx 10 \mu M$). Der normierte Strom bezieht sich auf den durch Rubidiumionen aktivierten Strom. Die Anzahl an Experimenten (n) wird über dem jeweiligen Datenpunkt angezeigt.

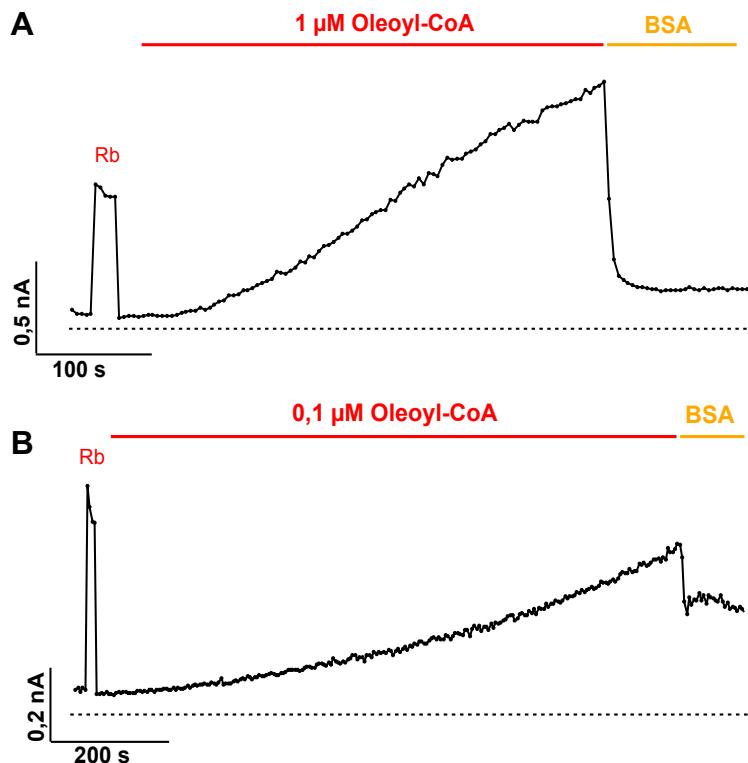


Abb. 3.12: Aktivierung von TALK-2 durch Oleoyl-CoA im einmikromolaren beziehungsweise submikromolaren Bereich. TALK-2, gemessen bei +80 mV, appliziert mit 1 μM (A) und 0,1 μM (B) Oleoyl-CoA. Zu Beginn Aktivierung durch Rubidiumionen zum Vergleich. Die Aktivierung durch 0,1 μM Oleoyl-CoA war nur teilweise durch BSA rückgängig zu machen. 5 mg/ml BSA.

3.2.3 Regulation weiterer K2P-Kanäle durch LC-CoA und PIP₂

In diesem Kapitel soll die Aktivierung der bereits geschilderten Membranlipide quantifiziert und für verschiedene weitere K2P-Kanäle untersucht werden.

Für die Quantifizierung wurden die K2P-Kanäle zunächst mit Rubidiumionen und anschließend mit 10 µM Oleoyl-CoA und 10 µM PIP₂ aktiviert (Abb. 3.13 und 3.14). Wie im Kap. 3.2.1 geschildert, konnte Oleoyl-CoA durch 5 mg/ml BSA ausgewaschen werden und auch die Wirkung von PIP₂ konnte durch 100 µg/ml PolyK aufgehoben werden.

Es wurden folgende K2P-Kanäle bezüglich der Regulation durch Membranlipide untersucht: TREK-1, TRAAK, TRESK und die gesamte TALK-Subfamilie, die TALK-1, TALK-2 und TASK-2 beinhaltet.

Als am besten geeignetes Mittel, um die Regulation unter den K2P-Kanälen verglichen zu können, hat sich für die Kanäle TREK-1, TALK-2, TRAAK und TALK-1 die Normierung der Oleoyl-CoA- und PIP₂-Aktivierung in Bezug auf die Aktivierung durch Rubidiumionen, die in Kap. 3.1.2 vorgestellt wurde, herausgestellt. Hierbei muss beachtet werden, dass bereits Rubidiumionen diese K2P-Kanäle hochpotent aktivieren (für TREK-1 und TRAAK wurde von Schewe et. al. (2016) ein Faktor von ungefähr 100 beschrieben).

Für die Kanäle TRESK und TASK-2 bezieht sich die Normierung auf den Kaliumausgangsstrom. Im Folgenden wird daher der Strom bei 10 µM Oleoyl-CoA beziehungsweise 10 µM PIP₂ als „normierter Strom“ (Oleoyl-CoA_{norm.}, PIP_{2norm.}) bezeichnet. Bei Messungen des TREK-1, TALK-2, TRAAK und TALK-1 wurde demnach der Rubidium-aktivierte Strom des jeweiligen Kanals als „eins“ festgelegt, während beim TRESK und TASK-2 der Kaliumausgangsstrom den Wert „eins“ annimmt (Abb. 3.15).

Es kann festgehalten werden, dass Oleoyl-CoA und PIP₂ auf TREK-1, TALK-2, TRAAK und TALK-1 aktivierend wirkten, wobei sich das Ausmaß der Aktivierung zwischen den Kanälen unterschied.

Die stärkste Aktivierung beider Lipide zeigte der TRAAK-Kanal mit einer normierten Oleoyl-CoA-Aktivierung von $6,18 \pm 0,71$ und einer normierten PIP₂-Aktivierung von $3,62 \pm 0,85$ (Abb. 3.13C). Die Aktivierung des TRAAK durch PIP₂ wurde bereits beschrieben (Lopes et al., 2005).

Auch der TALK-2 zeigte eine starke normierte Oleoyl-CoA-Aktivierung von $5,45 \pm 0,82$ (Abb. 3.13B). Erstaunlicherweise war jedoch die normierte PIP₂-Aktivierung schwach ($0,86 \pm 0,25$), was schon im vorherigen Kapitel dargestellt wurde.

Die normierte Aktivierung des TREK-1 durch Oleoyl-CoA betrug $2,12 \pm 0,27$ und durch PIP₂ $1,66 \pm 0,29$ (Abb. 3.13A).

Der TALK-1 wurde nur wenig durch beide Lipide aktiviert (Oleoyl-CoA_{norm.}: $0,25 \pm 0,06$; PIP_{2norm.}: $0,08 \pm 0,01$; Abb. 3.13D).

Es wurden jedoch nicht alle K2P-Kanäle durch die Membranlipide aktiviert. TASK-2 zeigte weder eine Reaktion auf $10 \mu\text{M}$ Oleoyl-CoA noch auf $10 \mu\text{M}$ PIP₂ und wurde auch nicht durch Rubidiumionen aktiviert (Abb. 3.14A). Letzteres hat zur Folge, dass sich beim TASK-2 der normierte Strom auf den Kaliumausgangstrom bezieht. Der normierte Strom unter Oleoyl-CoA und PIP₂ beträgt daher 1. Als Beweismittel, dass der Kanal in der Membran exprimiert wurde, wurde die Tatsache ausgenutzt, dass er durch Alkalisierung des intrazellulären pH-Werts aktiviert werden kann (Niemeyer et al., 2010).

TRESK wurde als einziger der untersuchten K2P-Kanäle durch Oleoyl-CoA und PIP₂ inhibiert. Auch bei diesem Kanal bezieht sich der normierte Strom auf den Kaliumausgangstrom. Nach $10 \mu\text{M}$ Oleoyl-CoA-Gabe beträgt der normierte Strom $0,26 \pm 0,06$ und nach $10 \mu\text{M}$ PIP₂-Applikation $0,54 \pm 0,22$ (Abb. 3.14.B).

Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Regulation durch die Membranlipide Oleoyl-CoA und PIP₂ unter den K2P-Kanälen nicht einheitlich ist. Einige Kanäle werden aktiviert, andere werden inhibiert beziehungsweise gar nicht beeinflusst (Abb. 3.15).

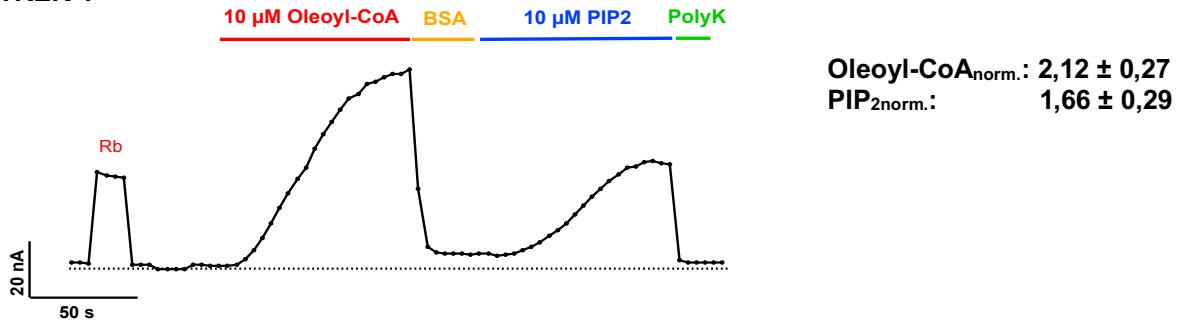
Bezüglich der TALK-Familie ist zu sagen, dass TALK-2 der einzige Kanal ist, der auf Oleoyl-CoA eine nennenswerte Aktivierung zeigt.

Im Vergleich zu den K_{iR}-Kanälen, die alle durch PIP₂ aktiviert werden, jedoch abgesehen vom K_{ATP} von Oleoyl-CoA inhibiert werden, lässt sich bei den K2P-Kanälen zeigen, dass sie sich bezüglich der beiden Lipide weitestgehend kongruent verhalten. Allein TALK-2 zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der Potenz der Oleoyl-CoA- und der PIP₂-Aktivierung.

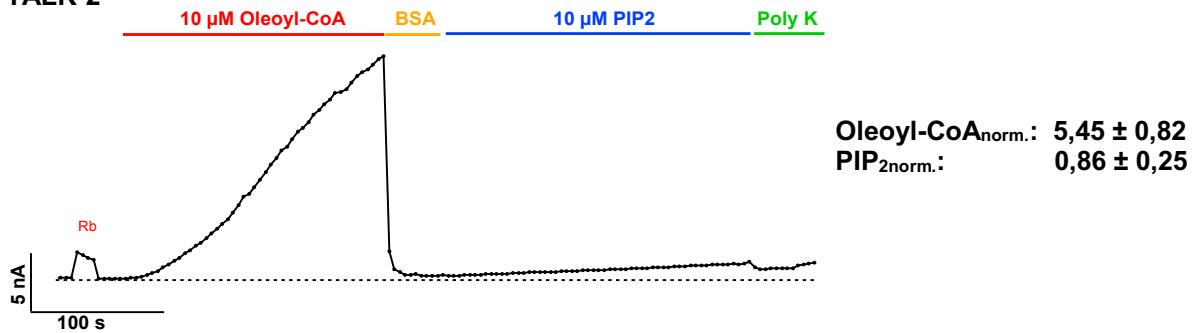
LC-CoA ist ein in dieser Arbeit erstmalig beschriebener potenter Aktivator für die K2P-Kanäle TREK-1, TRAAK und TALK-2.

3. Ergebnisse

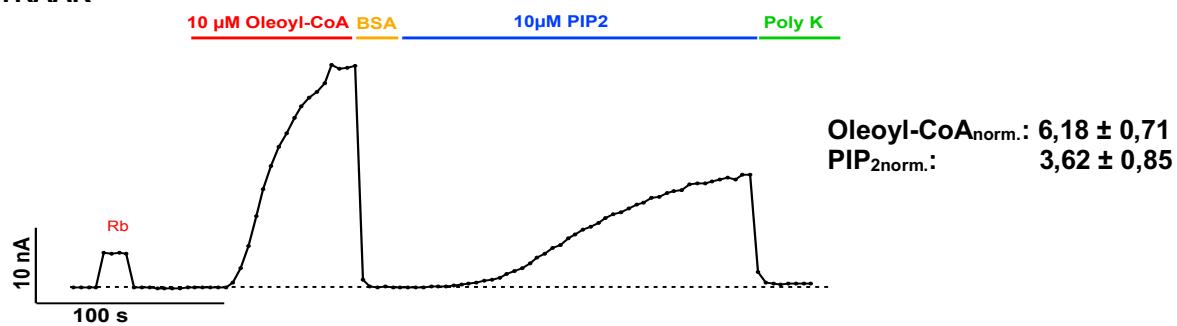
A TREK-1



B TALK-2



C TRAAK



D TALK-1

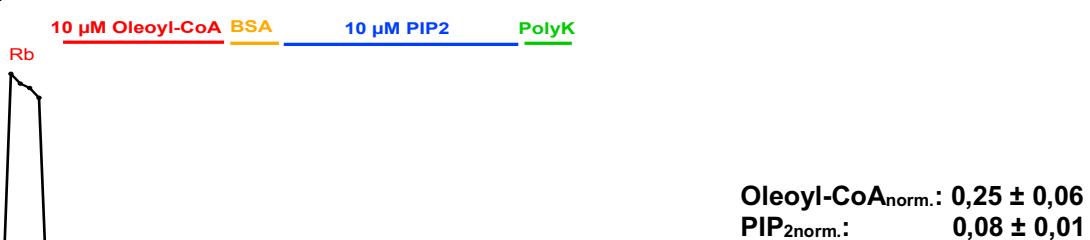
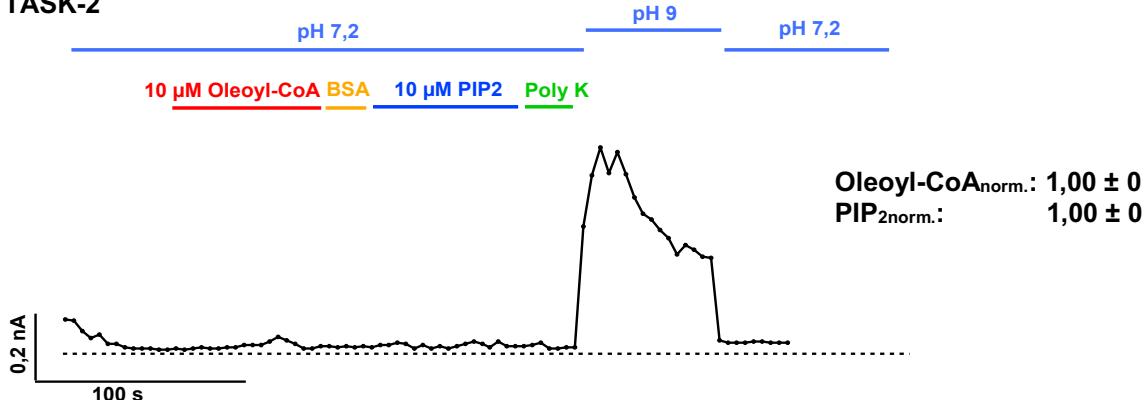


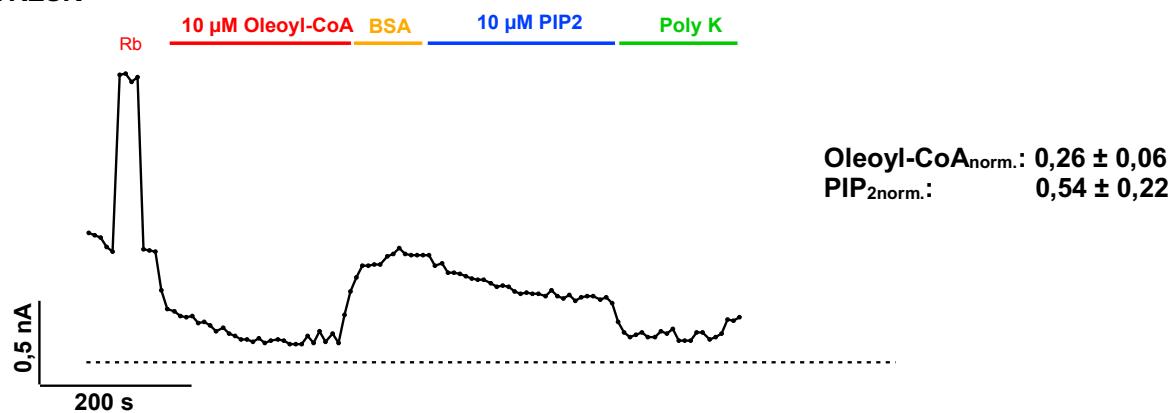
Abb. 3.13: Regulation von K2P-Kanälen durch Oleoyl-CoA und PIP₂. K2P-Kanäle, gemessen bei +80 mV, appliziert mit 10 μM Oleoyl-CoA und anschließend ausgewaschen mit 5 mg/ml BSA. Danach Applikation von 10 μM PIP₂, das anschließend durch 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PolyK gebunden wurde. Aktivierung durch Rubidiumionen (Rb) zum Vergleich. **(A)** TREK-1: Oleoyl-CoA_{norm.}: $2,12 \pm 0,27$ (n=8); PIP_{2norm.}: $1,66 \pm 0,29$ (n=3); **(B)** TALK-2: Oleoyl-CoA_{norm.}: $5,45 \pm 0,82$ (n=10); PIP_{2norm.}: $0,86 \pm 0,25$ (n=6); **(C)** TRAAK: Oleoyl-CoA_{norm.}: $6,18 \pm 0,71$ (n=5); PIP_{2norm.}: $3,62 \pm 0,85$ (n=4); **(D)** TALK-1: Oleoyl-CoA_{norm.}: $0,25 \pm 0,06$ (n=5); PIP_{2norm.}: $0,08 \pm 0,01$ (n=2). Die normierten Ströme Oleoyl-CoA_{norm.} und PIP_{2norm.} beziehen sich auf den Rubidiumstrom. Jeder Datenpunkt entspricht dem Durchschnittswert \pm SEM.

3. Ergebnisse

A TASK-2



B TRESK

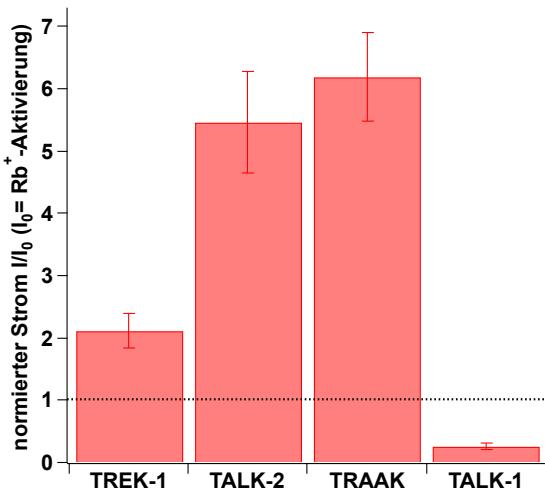


3.14: Regulation von K₂P-Kanälen durch Oleoyl-CoA und PIP₂. K₂P-Kanäle, gemessen bei +80 mV, appliziert mit 10 µM Oleoyl-CoA und anschließend ausgewaschen mit 5 mg/ml BSA. Danach Applikation von 10 µM PIP₂, das anschließend durch 100 µg/ml PolyK gebunden wurde. Zu Beginn Aktivierung durch Rubidiumionen (Rb) zum Vergleich. Beachte: Um die Expression der TASK-2-Kanäle in der Membran zu beweisen, wurden sie mit pH 9 aktiviert.

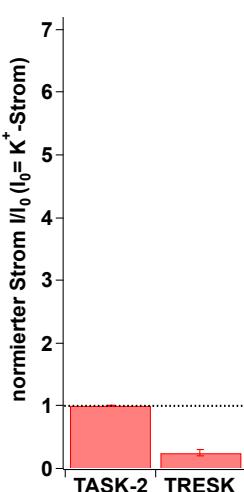
(A) TASK-2: Oleoyl-CoA_{norm.}: 1,00 ± 0,0 (n=5); PIP_{2norm.}: 1,0 ± 0,0 (n=5); (B) TRESK: Oleoyl-CoA_{norm.}: 0,26 ± 0,06 (n=5); PIP_{2norm.}: 0,54 ± 0,22 (n=4). Die normierten Ströme Oleoyl-CoA_{norm.} und PIP_{2norm.} beziehen sich auf den Kaliumstrom.

Oleoyl-CoA_{norm.}

A

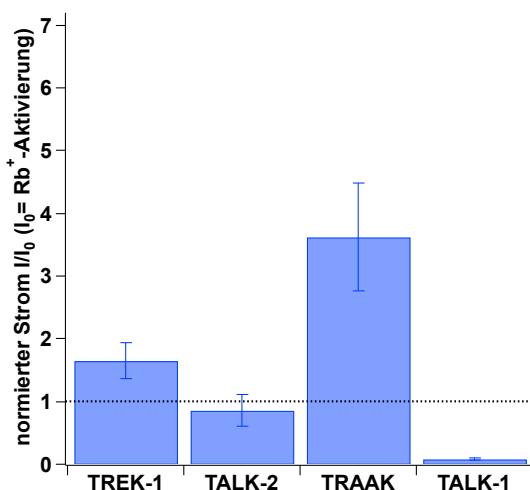


B



PIP_{2norm.}

C



D

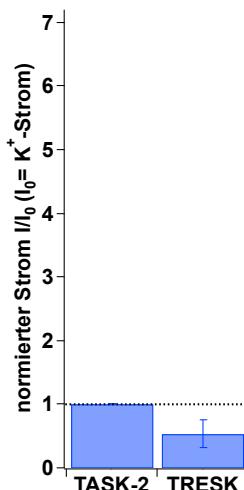


Abb. 3.15 Regulation der K2P-Kanäle durch Membranlipide im Vergleich. Quantifizierung der Regulation durch 10 μM Oleoyl-CoA (A und B) und durch 10 μM PIP₂ (C und D). Strom bei 10 μM Oleoyl-CoA/PIP₂ (Oleoyl-CoA_{norm.}/PIP_{2norm.}) normiert auf den durch Rubidiumionen aktivierte Strom (A und C) beziehungsweise normiert auf den Kaliumausgangsstrom (B und D). (A) und (C) TREK-1, TALK-2, TRAAK und TALK-1 wurden sowohl durch Oleoyl-CoA als auch durch PIP₂ aktiviert, jedoch mit unterschiedlicher Potenz. (B) und (D) TASK-2 zeigte keine Regulation und TRESK wurde durch beide Lipide inhibiert.

(A) und (C) TREK-1: Oleoyl-CoA_{norm.}: $2,12 \pm 0,27$ (n=8); PIP_{2norm.}: $1,66 \pm 0,29$ (n=3); TALK-2: Oleoyl-CoA_{norm.}: $5,45 \pm 0,82$ (n=10); PIP_{2norm.}: $0,86 \pm 0,25$ (n=6); TRAAK: Oleoyl-CoA_{norm.}: $6,18 \pm 0,71$ (n=5); PIP_{2norm.}: $3,62 \pm 0,85$ (n=4); TALK-1: Oleoyl-CoA_{norm.}: $0,25 \pm 0,06$ (n=5); PIP_{2norm.}: $0,08 \pm 0,01$ (n=2). Die normierten Ströme Oleoyl-CoA_{norm.} und PIP_{2norm.} beziehen sich auf den Rubidiumstrom.

(B) und (D) TASK-2: Oleoyl-CoA_{norm.}: $1,00 \pm 0,0$ (n=5); PIP_{2norm.}: $1,0 \pm 0,0$ (n=5); TRESK: Oleoyl-CoA_{norm.}: $0,26 \pm 0,06$ (n=5); PIP_{2norm.}: $0,54 \pm 0,22$ (n=4). Die normierten Ströme Oleoyl-CoA_{norm.} und PIP_{2norm.} beziehen sich auf den Kaliumstrom.

3.2.4 Struktur-Funktionsbeziehungen der Membranlipide

Nachdem LC-CoA am Beispiel von Oleoyl-CoA als neuer Aktivator von bestimmten K2P-Kanälen im vorherigen Kapitel beschrieben worden war, sollten nun weitere LC-CoA untersucht werden, um eine Beziehung zwischen Struktur und Funktion herstellen zu können.

Da TALK-2 sehr stark auf Oleoyl-CoA reagierte hatte, wurde dieser Kanal für die nun folgende Fragestellung der Struktur-Funktionsbeziehungen verwendet.

Das bisher eingesetzte Lipid Oleoyl-CoA enthält eine Fettsäure mit einer Kettenlänge von 18 Kohlenstoffatomen und einer Doppelbindung, es handelt sich demnach um eine einfach ungesättigte Fettsäure (18:1, Ölsäure).

Im Folgenden werden die entsprechenden LC-CoA je nachdem, welche Fettsäure sie enthalten, vereinfacht als Zahlenfolge „Anzahl Kohlenstoffatom : Anzahl Doppelbindungen“ bezeichnet.

Zunächst einmal wurde die Abhängigkeit der Aktivierung vom Grad der Sättigung untersucht. Dafür wurden 3 µM verschiedener LC-CoA eingesetzt, bei denen die Kettenlänge der Fettsäure konstant gehalten (18 C-Atome), jedoch die Anzahl an Doppelbindungen in der Fettsäure verändert wurde (von 18:3 bis 18:0).

Die jeweilige LC-CoA-Aktivierung wurde auf die Rubidiumaktivierung normiert, weshalb zu Beginn mit Rubidiumionen aktiviert wurde (Abb. 3.16A und B). Durch Auswasch jedes einzelnen Lipids durch 5 mg/ml BSA konnten mehrere LC-CoA in einem Patch appliziert werden. Wie Abb. 3.16A darstellt, zeigte 18:3 (9Z, 12Z, 15Z-Linolenoyl-CoA) eine vernachlässigbar kleine Aktivierung ($0,27 \pm 0,06$), die durch 18:2 (9Z, 12Z-Linoyl-CoA) nur minimal erhöht werden konnte ($0,7 \pm 0,17$). Erst bei Applikation von 18:1 (9Z-Oleoyl-CoA) kam es zu einer potenteren Aktivierung ($4,41 \pm 0,84$), die sogar durch 18:0 (Stearoyl-CoA) noch deutlich gesteigert werden konnte ($11,69 \pm 1,98$), weshalb in Abb. 3.16A kein steady-state erreicht wurde. Aus diesem Grund ist der Unterschied zwischen 18:1 und 18:0 in Abb. 3.16B nochmals einzeln aufgeführt.

Zusammenfassend lässt sich anhand des Balkendiagramms (Abb. 3.16C) festhalten, dass LC-CoA mit einer gesättigten Fettsäure (18:0) die größte Aktivierung bewirkt. Die Wirkung scheint mit der Anzahl der Doppelbindungen abzunehmen.

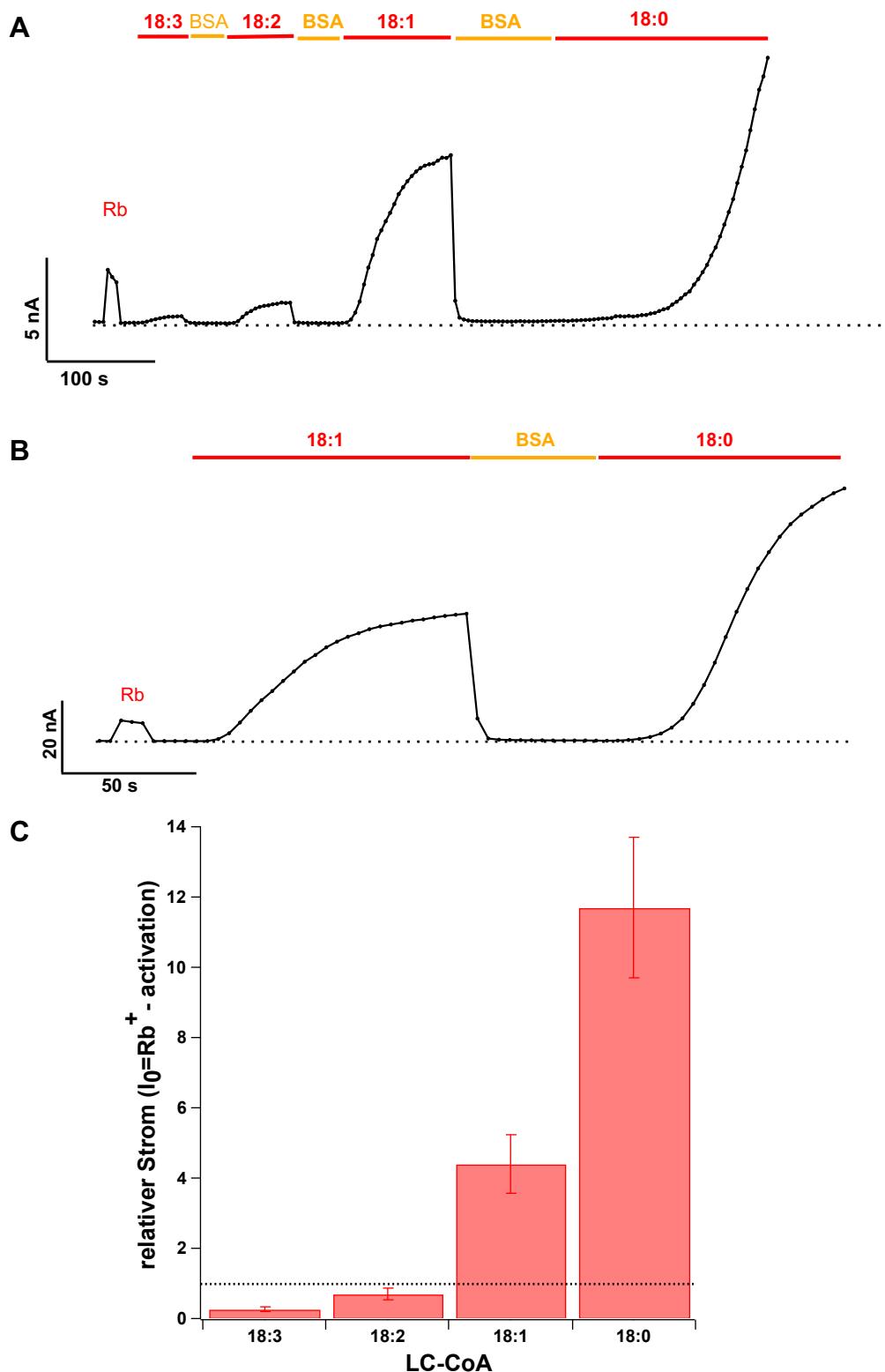


Abb. 3.16: Grad der Sättigung von LC-CoA bestimmt Maß der Aktivierung beim TALK-2. (A) und (B) TALK-2, gemessen bei +80 mV, appliziert mit 3 µM LC-CoA, die sich in der Art der Fett-säure unterschieden (18:3, 18:2, 18:1 beziehungsweise 18:0). Auswasch durch 5 mg/ml BSA. (C) Entsprechende LC-CoA-Aktivierung des TALK-2 normiert auf die Rubidiumaktivierung. Linolenoyl-CoA (18:3): $0,27 \pm 0,06$; Linoyl-CoA (18:2): $0,7 \pm 0,17$; Oleoyl-CoA (18:1): $4,41 \pm 0,84$; Stearoyl-CoA (18:0): $11,69 \pm 1,98$ ($n=6$). Jeder Datenpunkt entspricht dem Durchschnittswert ± SEM.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Kettenlänge auf die Potenz der Aktivierung von TALK-2 untersucht. Hierfür wurden LC-CoA mit gesättigten Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge (14:0, 16:0, 18:0, 22:0 und 26:0) eingesetzt. Appliziert wurden jeweils 3 µM und deren Aktivierung wurde wiederum auf die Rubidiumaktivierung normiert.

Die Abb. 3.17 zeigt, dass der Grad der Aktivierung von Myristoyl-CoA (14:0), bei dem kaum Aktivierung auftrat ($0,108 \pm 0,04$), über Palmitoyl-CoA (16:0; $2,96 \pm 0,73$) bis Stearoyl-CoA (18:0; $11,69 \pm 1,98$) stark zunahm und bei Applikation von Stearoyl-CoA sein Maximum erreichte und bei Behenoyl-CoA (22:0) wieder abnahm ($7,79 \pm 1,81$) und bei Hexacosanoyl-CoA (26:0) sein Minimum erreichte ($0,1 \pm 0,01$).

Diese Daten zeigen, dass das Stearinäure enthaltende LC-CoA am potentesten wirkt. Kettenlängen unterhalb von 16 C-Atomen zeigen keinen Effekt und interessanterweise verliert sich die Wirkung auch im sehr langen Kettenlängen-Bereich.

Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, ob auch die beiden Moleküle, aus denen LC-CoA zusammengesetzt ist, alleine eine Wirkung entfachen können. Daher wurden 10 µM Oleoyl-CoA im Vergleich mit 100 µM CoA und 20 µM Ölsäure gemessen (Abb. 3.18) und festgestellt, dass Coenzym A und Fettsäuren keine Wirkung zeigen.

Da die Wirkung von PIP₂ durch Polylysin am K2P-Kanal aufgehoben werden konnte (Abb. 3.7), stellte sich nun die Frage, ob dies auch mit Oleoyl-CoA möglich ist und dessen Wirkung durch Zugabe von Polylysin/PolyK rückgängig gemacht werden kann.

Abb. 3.19 zeigt die Wirkung von PolyK auf den durch 10 µM Oleoyl-CoA aktivierte TALK-2-Kanal. PolyK machte die Aktivierung innerhalb von weniger als zehn Sekunden rückgängig, was der zeitlichen Kinetik von BSA ähnelte und auf PolyK zurückzuführen war, da es ohne Zugabe von PolyK etwa 100 Sekunden dauerte, bis der Oleoyl-CoA-aktivierte Strom beseitigt werden konnte (Abb. 3.19).

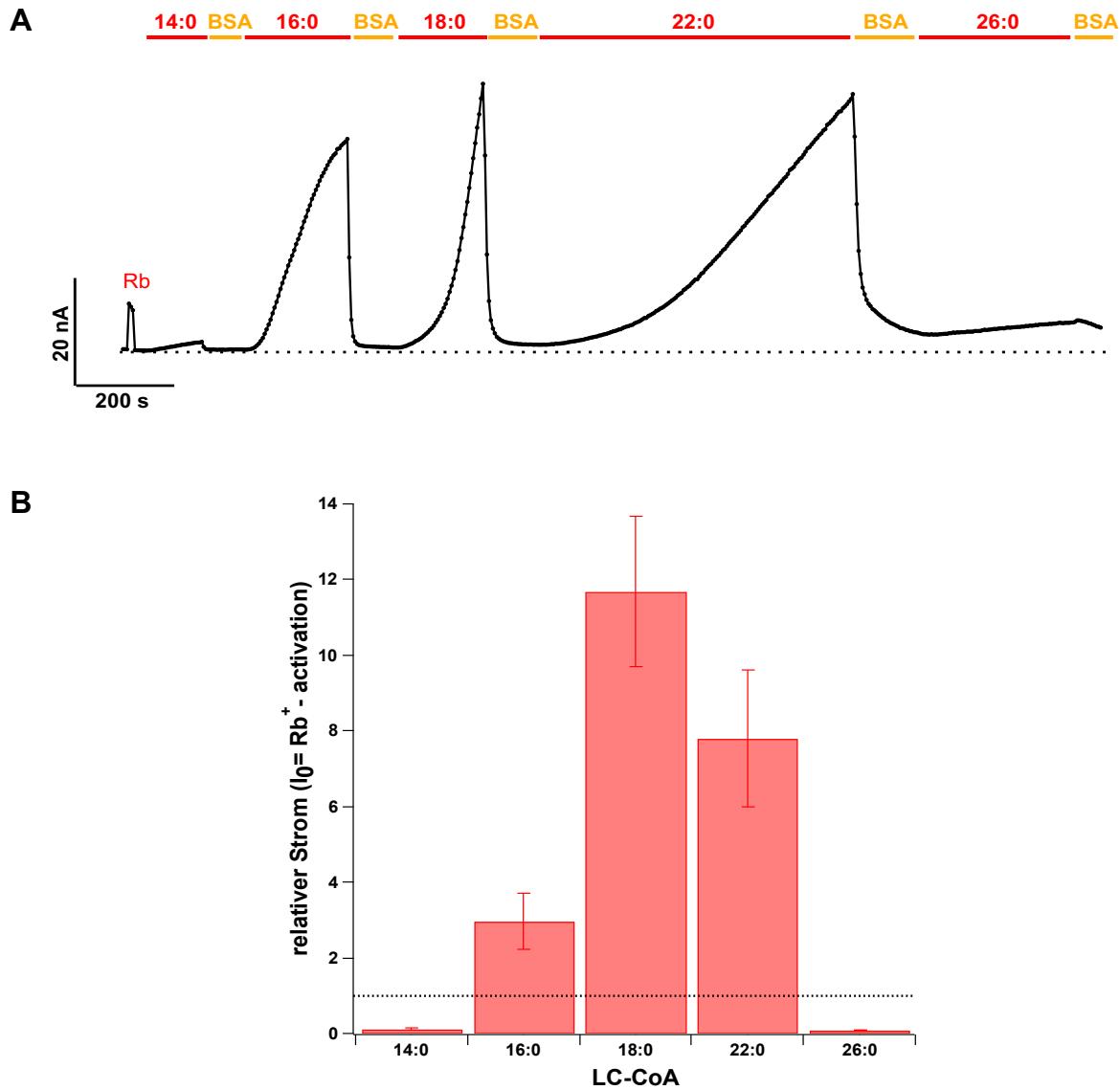


Abb. 3.17: Kettenlänge von LC-CoA bestimmt Maß der Aktivierung beim TALK-2. (A) TALK-2, gemessen bei +80 mV, appliziert mit 3 μ M LC-CoA, die sich in der Länge der Fettsäure unterschieden (14:0, 16:0, 18:0, 22:0 beziehungsweise 26:0). Auswasch durch 5 mg/ml BSA. Bei Applikation von 18:0 wurde bei der gezeigten Messung kein steady-state abgewartet. (B) Entsprechende LC-CoA-Aktivierung des TALK-2 normiert auf die Rubidiumaktivierung. Myristoyl-CoA (14:0): $0,108 \pm 0,04$; Palmitoyl-CoA (16:0): $2,96 \pm 0,73$; Stearoyl-CoA (18:0): $11,69 \pm 1,98$; Behenoyl-CoA (22:0): $7,79 \pm 1,81$; Hexacosanoyl-CoA (26:0): $0,1 \pm 0,01$ (n=7). Jeder Datenpunkt entspricht dem Durchschnittswert \pm SEM.

3. Ergebnisse

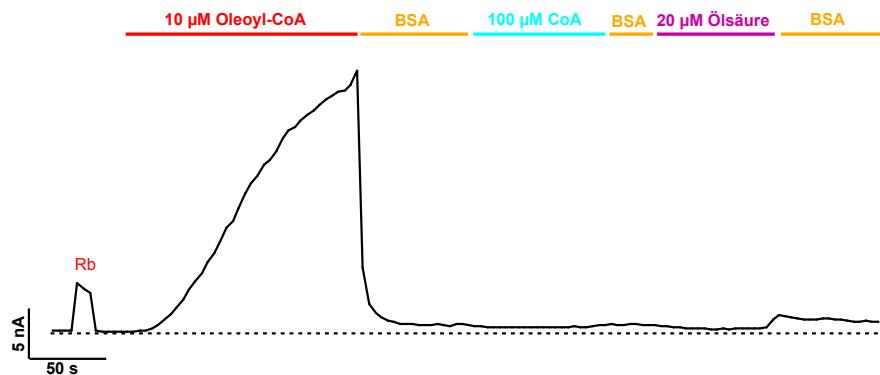


Abb. 3.18: Wirkung von Coenzym A und Ölsäure am TALK-2. Gemessen bei +80 mV. Während 10 μ M Oleoyl-CoA eine potente Aktivierung erzielten, hatten 100 μ M Coenzym A und 20 μ M Ölsäure keine Wirkung. Als Auswasch wurden 5 mg/ml BSA verwendet.

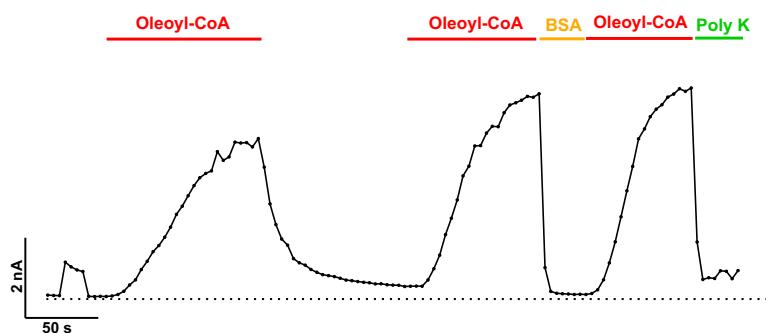


Abb. 3.19: Wirkung von Polylysin (PolyK) nach Oleoyl-CoA-Aktivierung am TALK-2. Gemessen bei +80 mV, Applikation von 10 μ M Oleoyl-CoA, 5 mg/ml BSA und 100 μ g/ml PolyK. Der Rückgang der Oleoyl-CoA-Aktivierung dauerte ungefähr 100 Sekunden, während PolyK durch Binden von Oleoyl-CoA dessen Aktivierung innerhalb von 10 Sekunden rückgängig machte.

4. Diskussion

4.1 Regulation von K2P-Kanälen durch Pharmaka

K2P-Kanäle sind in vielen pathophysiologisch relevanten Prozessen involviert (siehe Kap. 1.7) und stellen daher interessante Zielproteine für die pharmakologische Forschung dar. Gegenwärtig existiert ein Mangel an spezifischen pharmakologischen K2P-Kanal-Aktivatoren und insbesondere für TALK-2 ist noch kein solcher Aktivator beschrieben worden.

In dieser Arbeit werden mit 2-APB und Drofenin die ersten pharmakologischen TALK-2-Kanal-Aktivatoren identifiziert.

Sowohl 2-APB als auch Drofenin zeigen eine Aktivierung im mikromolaren Bereich. Das membranpermeable 2-APB, als Inhibitor von IP₃-induzierter Calcium-Freisetzung bekannt (Maruyama et al., 1997), wurde bereits von Beltran et. al. (2013) als hoch-effektiver Aktivator der TREK-Subfamilie beschrieben.

Mit TALK-2 kann nun also eine weitere K2P-Klasse als Zielstruktur von 2-APB aufgezeigt werden, was dessen Spezifität und folglich die Wirksamkeit dieses Medikaments eingrenzt.

Es kann dennoch Verwendung finden, um als pharmakologisches Hilfsmittel für die weitere Erforschung von TREK-1, TREK-2, TRAAK aber auch des TALK-2 zu dienen. Ob sich weitere K2P-Kanäle aktivieren lassen, müssen zukünftige Experimente zeigen. Darüber hinaus kann 2-APB als Ausgangssubstanz zur Entwicklung weiterer Moleküle genutzt werden, indem dessen chemischen und pharmakologischen Charakteristika für das zukünftige Design von Medikamenten in Betracht gezogen werden (Beltran et al., 2013).

Diese Aussage wird dadurch erhärtet, dass das Strukturhomologon Drofenin ebenfalls zur Aktivierung des TALK-2 (mit ähnlicher Affinität) führt. Es bestehen somit zwei Substanzen, die die gleiche Wirkung besitzen und zudem strukturähnlich sind (Struktur von 2-APB und Drofenin siehe Abb. 3.5D). Dies impliziert, dass eine strukturelle Basis in der Ähnlichkeit existiert, was die Entwicklung neuer Medikamente erleichtern könnte.

Die Erkenntnisse, die in dieser Arbeit am exzidierten Membranpatch gewonnen wurden, sollten auf den Kontext der Physiologie einer Zelle übertragen werden. Zukünftige Experimente an Zellen müssen zeigen, welche Auswirkungen die genannten Substanzen auf die Elektrophysiologie von Neuronen oder Herzmuskelzellen haben. Es muss hierbei beachtet werden, dass 2-APB seine Wirkung zusätzlich auf weitere Proteine entfaltet. Daher wäre es interessant zu sehen, welchen Einfluss 2-APB und Drofenin auf Zellen haben, die K2P- und TRPV-Kanäle koexprimieren. Es ist bekannt, dass bestimmte Kationenkanäle der TRPV-Subgruppe, welche unter anderem an der Schmerz- und Temperaturempfindung in Neuronen beteiligt sind, ebenfalls durch diese Substanzen aktiviert werden (Hu et al., 2004, Deering-Rice et al., 2014). Während eine Aktivierung der K2P-Kanäle zu einer Hyperpolarisation führen würde, käme es bei Stimulation der TRPV-Kanäle zur Depolarisation. Weitere Studien müssen zeigen, welche Eigenschaft bei Koexpression dominiert.

Die Wirkung von 2-APB wurde in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit am TREK-2-Kanal untersucht. Zhuo et al. (2015) konnten zeigen, dass für die Wirkung von 2-APB am TREK-2 der proximale C-Terminus entscheidend ist (gelb markiert in Abb. 4.1), wobei das Histidin an Position 368 der Aminosäurekette (H368) die Schlüsselrolle für die Aktivierung einnimmt. Als sekundäre Bindungsstelle wurde der zytosolische Anteil des zweiten Transmembransegments identifiziert. Der distale Anteil des C-Terminus hingegen agiert als negativer Modulator für die 2-APB-Stimulierung. Während viele Wirkmechanismen den Selektivitätsfilter involvieren, sind die genannten Regionen nicht am Gating des Selektivitätsfilters beteiligt. Als Wirkungsweise wird postuliert, dass die Bindung von 2-APB eine Konformationsänderung des proximalen C-Terminus induziere, was zur Anlagerung des C-Terminus an die Plasmamembran führe und den Kanal dadurch öffne (Zhuo et al., 2015).

Zukünftige Experimente müssen zeigen, ob eine ähnliche Bindungsstelle am C-Terminus für den TALK-2 existiert. H368 ist unter den K2P-Kanälen nicht konserviert, dennoch können die Daten genutzt werden, um in zukünftigen Experimenten durch Mutagenese Anhaltspunkte für die Bindungsstelle beim TALK-2-Kanal zu erlangen.

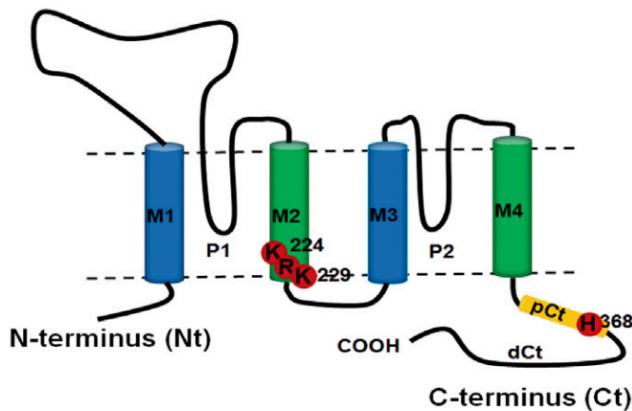


Abb. 4.1: Schematische Darstellung einer TREK-2-Untereinheit (Zhuo et al., 2015). Regionen am TREK-2, die am aktivierenden Effekt von 2-APB beteiligt sind, sind rot und gelb hervorgehoben. Transmembransegmente (M1-4), intrazellulärer N-Terminus (Nt), intrazellulärer C-Terminus (Ct), proximaler C-Terminus (pCt, gelb), distaler C-Terminus (dCt), Schlüsselpositionen der Aminosäurekette (rot).

Als weitere neue Erkenntnis im Verständnis der strukturellen Funktionalität des TALK-2-Kanals konnte in dieser Arbeit eine Abhängigkeit der TPA⁺-Inhibition von der Art der Aktivierung festgestellt werden.

Wie im Kapitel 3.1.4 beschrieben, werden quartäre Ammoniumionen, zu denen Tetrapentylammonium (TPA⁺) gehört, in der Elektrophysiologie zur Erforschung unter anderem der Porenstruktur und der Gating-Mechanismen genutzt.

Nachdem Piechotta et. al. (2011) den Block von K2P-Kanälen durch quartäre Ammoniumionen und dessen zu Grunde liegenden Mechanismus gezeigt hatten, wurde in dieser Arbeit der TPA⁺-Block am TALK-2 im Vergleich zum TREK-1 genauer untersucht und es wurden interessante Unterschiede festgestellt.

Die Gabe von 1 mM TPA⁺ führte beim TREK-1 unabhängig vom eingesetzten Aktivator (2-APB, Rubidiumionen, pH) zu einem fast vollständigen Block, während dies beim TALK-2 nicht der Fall war. Es zeigte sich eine klare Abhängigkeit der Inhibition vom Aktivierungsprotokoll (Abb. 3.6).

Für die Interpretation dieses Sachverhalts ist das Wissen um die Bindungsstelle von TPA⁺ wichtig. Sie liegt beim TREK-1 in der Kavität der Pore direkt unterhalb des Selektivitätsfilters an der Kaliumbindungsstelle S4 (Abb. 1.6) (Piechotta et al., 2011). In Abb. 4.2B sind die Bindungsstellen von TPA⁺ grün hervorgehoben.

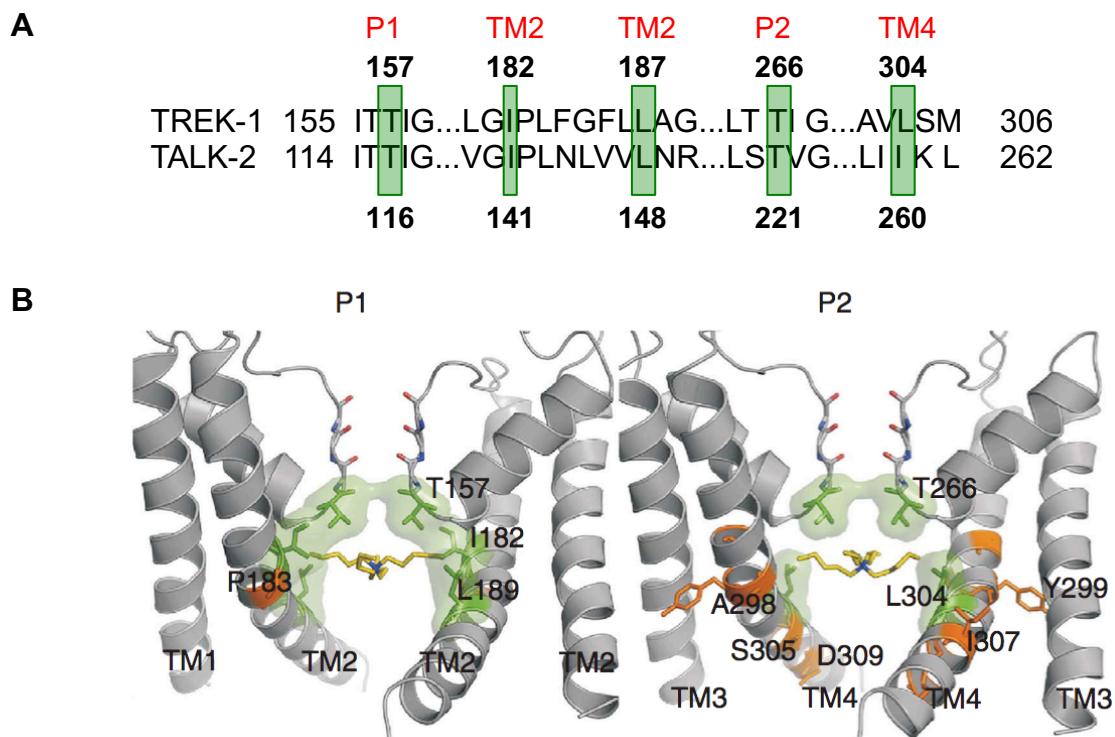


Abb. 4.2: TPA⁺-Bindung an K2P-Kanälen. (A) Sequenz-Alignment zwischen TREK-1 und TALK-2 der Bindungsstellen (grün) von TPA⁺ am TREK-1. **(B)** KvAP-basiertes homologes Modell des TREK-1 (nur eine Untereinheit dargestellt) (Piechotta et al., 2011). Die Bindungsstellen von TPA⁺ sind grün markiert. Transmembrandomänen (TM1-4), Porenregion (P1-2).

Wenn man das Sequenz-Alignment der beiden Kanäle bezüglich der Aminosäurereste am TREK-1, die direkt mit TPA⁺ interagieren, vergleicht, stellt man fest, dass sie konserviert sind, weshalb von einer konservierten Bindungsstelle auszugehen ist (Abb. 4.2A). Dass im TALK-2 die Bindungsstelle von TPA⁺ ebenfalls in der Kavität liegt, ist somit sehr wahrscheinlich und könnte durch Mutagenese der homologen Aminosäuren 116, 141, 148, 221 und 260 in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

Das Resultat der Abhängigkeit der TPA⁺-Inhibition von der Art der Aktivierung ist bisher noch für keinen Ionenkanal beschrieben worden und könnte eine charakteristische Eigenschaft des TALK-2 sein.

Vier mögliche Erklärungsansätze kommen für dieses Phänomen in Frage (Abb. 4.3): Erstens, das Helix-Bundle-Crossing ist für diesen Kanal im geschlossenen Zustand geschlossen. Dies ist jedoch nicht konsistent mit der starken Aktivierung durch Rubi-

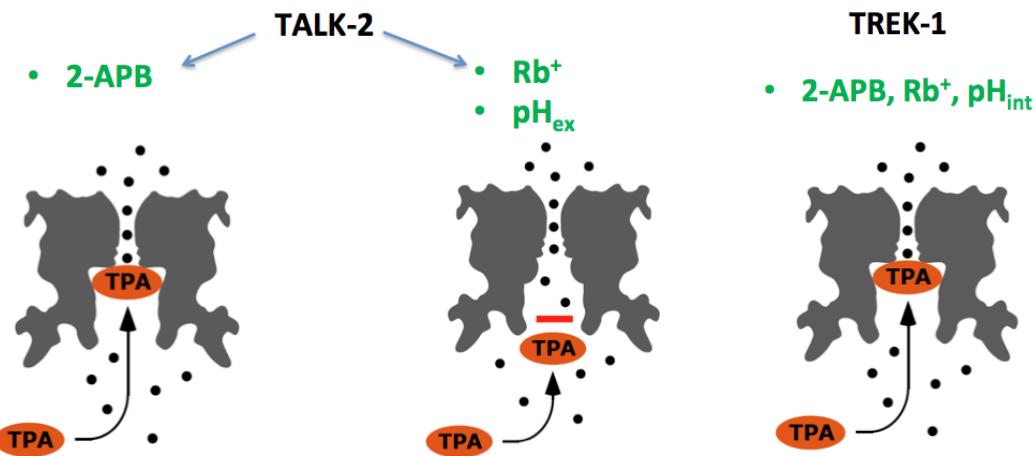


Abb. 4.3 Schematische Darstellung des TPA⁺-Blocks von TALK-2 und TREK-1 im Vergleich. Der Block des 2-APB-aktivierten TALK-2 ähnelt demjenigen des TREK-1 (linke und rechte Darstellung). Die TPA⁺-Bindungsstellen liegen frei und sind aktiv, während dies beim durch Rubidiumionen- oder pH-aktivierten TALK-2 nicht der Fall ist (mittige Darstellung).

diumionen, welche den Spannungssensor im Selektivitätsfilter aktivieren (Schewe et al., 2016). Bei geschlossenem unterem Gate wäre diese Aktivierung nicht möglich. Auch Piechotta et. al. (2011) zeigten, dass bei den K2P-Kanälen kein Gate am Helix-Bundle-Crossing existiert. Somit ist diese Hypothese unwahrscheinlich. Zweitens, der Porendurchmesser verändert sich und das TPA⁺-Molekül kann daher nicht an seine Bindungsstelle gelangen. Hierbei würde sich der Öffnungs durchmesser des Poreneingangs je nach Aktivierungsmodus verändern, ohne die Permeation der Ionen zu beeinflussen.

Drittens, die TPA⁺-Bindungsstelle und die Transmembrandomänen sind im TALK-2-Kanal dynamisch, das heißt, dass sich die TM-Helices bei der Aktivierung drehen. Unter 2-APB wären sie so konfiguriert wie im TREK-1, während unter Rubidiumionen- beziehungsweise pH-Aktivierung eine andere Konfiguration der TM-Helices vorliegt. Hierdurch verändert sich die exakte Orientierung der Aminosäurereste und damit die Bindungsstelle.

Viertens, eine möglicherweise beim TALK-2-Kanal kaum besetzte S4-Bindungsstelle (Abb. 1.6) während der 2-APB-aktivierten Kaliumpermeation erleichtert die Interaktion von TPA⁺ mit der Threoninseitenkette an S4, während die S4-Stelle unter Rubidiumpermeation stärker besetzt sein könnte und dadurch die TPA⁺-Affinität aufgrund einer verstärkten Kompetition sinkt (Schewe et al., 2016). Extrazellulärer pH 10 könnte die S1-S4-Besetzungsrate verändern und so ebenfalls eine Änderung in der Kom petition an S4 bewirken.

Ob die zweite, dritte oder vierte Hypothese zutreffend ist, kann in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es ist wahrscheinlich, dass der Poreneingang stets offen ist, es ist jedoch unklar, ob sich der Öffnungs durchmesser der Pore verändert, da dies mit Kaliumionen aufgrund ihrer zu geringen Größe nicht festgestellt werden kann.

Durch Einsatz kleinerer oder größerer quartärer Ammoniumionen könnte in zukünftigen Experimenten untersucht werden, ob beim TALK-2 je nach Aktivierungsart Unterschiede im Öffnungs durchmesser vorliegen.

Atomistische Molekulardynamik-Simulationen am TALK-2 könnten Aufschlüsse über die Besetzung der Bindungsstellen S1 bis S4 während der jeweiligen Aktivierung geben (Köpfer et al., 2014).

4.2 Membranlipid-Regulation von K2P-Kanälen im Vergleich zu Kir-Kanälen

Membranlipide stellen eine physiologisch wichtige chemische Klasse dar, die neben einer Vielzahl an Aufgaben im Bereich der intrazellulären Kommunikation auch an der Regulation von Kaliumionenkanälen beteiligt sind.

Um ein besseres Verständnis und ein erweitertes Wissen dieser Regulation zu erzielen, wurden in dieser Arbeit die Membranlipide PIP₂ und Acyl-Coenzym A (LC-CoA) an der größten Kaliumkanalklasse, den K2P-Kanälen, untersucht.

Es handelt sich bei beiden Membranlipidklassen um amphiphile Substanzen mit physiologisch sehr relevanten Funktionen (siehe Kap. 1.7).

Es ist bekannt, dass PIP₂, das zur Gruppe der Phospholipide zählt, eine große Anzahl an Kaliumionenkanälen beeinflusst. Alle Kir-Kanäle werden durch dieses Molekül aktiviert (Baukowitz et al., 1998, Huang et al., 1998, Lopes et al., 2002), was auch klinisch relevant ist, wenn durch Mutationen in Kir-Kanälen die Interaktion mit PIP₂ nicht möglich ist, wodurch es zum Bartter's Syndrom oder auch zum Andersen's Syndrom kommen kann (Lopes et al., 2002).

Seit 2005 (Chemin et al., 2005, Lopes et al., 2005, Honore, 2007) ist aber auch bekannt, dass bestimmte K2P-Kanäle durch PIP₂ reguliert werden. Wie durch die genannten Autoren gezeigt werden konnte, wird TREK-1 durch PIP₂ und andere Phos-

pholipide wie Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin stimuliert. Allesamt sind Bestandteile der intrazellulären Seite der Doppel lipidmembran.

Im Gegensatz zu den K_{ir} -Kanälen, die ohne Ausnahme durch PIP_2 aktiviert werden, stellt sich die Regulation bei den K2P-Kanälen nicht einheitlich dar. Durch Vergleich verschiedener K2P-Kanäle kann durch diese Arbeit gezeigt werden, dass einige Kanäle aktiviert, andere hingegen inhibiert werden beziehungsweise keine Beeinflussung erfahren. So werden TRAAK und TREK-1 durch PIP_2 äußerst potent stimuliert, wie bereits neben TASK-1 und TASK-3 von Chemin et. al. (2005) und Lopes et. al. (2005) gezeigt wurde, während TALK-2 nur gering aktiviert wird, TALK-1 kaum Aktivierung zeigt und TASK-2 nicht durch PIP_2 beeinflusst wird. Interessanterweise verhalten sich sogar die Kanäle einer Subgruppe heterogen, was anhand der TALK-Gruppe erkennbar wird, zu der neben TALK-2 auch TALK-1 und TASK-2 zählen. TRESK zeigt sogar eine durch PIP_2 vermittelte Inhibition (alle Daten werden in Kapitel 3.2.3 dargestellt).

Entscheidend für die Aktivierung von TREK-1 ist nicht die Größe der polare Kopfgruppe, da auch Phosphatidsäure aktivierend wirkt, sondern allein die Anwesenheit der negativen Phosphatgruppe am C3-Atom des Glycerins, weshalb Diacylglycerin zu keiner Aktivierung führt (Chemin et al., 2005).

Verantwortlich für die PIP_2 -Wirkung ist der zytosolische proximale C-Terminus des TREK-1, wo das negativ geladene PIP_2 wahrscheinlich elektrostatisch mit fünf positiv geladenen Aminosäuren interagiert (Abb. 4.4). Als Folge koppelt der C-Terminus an die Plasmamembran, wodurch der Kanal aktivierbar wird (Chemin et al., 2005).

In dieser Arbeit kann zudem erstmals die Regulation von K2P-Kanälen durch eine weitere Membranlipidklasse beschrieben werden. Bestimmte langkettige Acyl-Coenzym A (LC-CoA) stellten sich als äußerst potente endogene Aktivatoren bestimmter K2P-Kanäle heraus (siehe Kapitel 3.2.3).

Seit Ende der 1990er Jahre ist bekannt, dass der K_{ATP} -Kanal ($K_{ir}6.2$) durch Phosphatidylinositolphosphate aktiviert wird (Fan und Makielski, 1997, Baukowitz et al., 1998, Shyng et al., 2000). Zudem konnte aber auch an diesem Kanal mit LC-CoA noch eine weitere Lipidklasse als potenter Aktivator des K_{ATP} beschrieben werden

(Larsson et al., 1996, Branstrom et al., 1998, Gribble et al., 1998, Liu et al., 2001, Rohacs et al., 2003).

Interessanterweise wirkt LC-CoA im Gegensatz zu PIP₂ bei allen anderen untersuchten K_{ir}-Kanälen inhibierend (Rapedius et al., 2005).

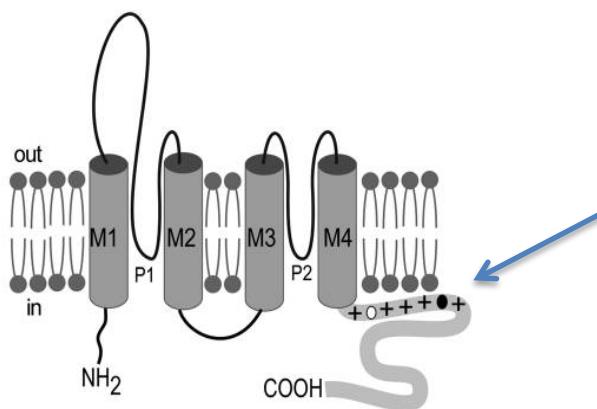


Abb. 4.4: Regulationsmechanismus von PIP₂ (Sandoz et al., 2011). Schematische Darstellung vom TREK-1. Mit „+“ sind die fünf Aminosäuren am C-Terminus gekennzeichnet (Pfeil), mit denen PIP₂ (aufgrund seiner Phosphatgruppen negativ geladen) in Interaktion tritt, wodurch es zur Kopplung des Kanals an die Plasmamembran und zur Aktivierung kommt.

Dass LC-CoA nicht nur auf K_{ir}-Kanäle wirkt, sondern auch auf K2P-Kanäle, konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden. TREK-1, TRAAK und TALK-2 haben sich als durch LC-CoA äußerst potent aktivierbare Kanäle herausgestellt. Bezuglich der TALK-Familie ist jedoch der TALK-2 der einzige Kanal, der sich durch LC-CoA nennenswert aktivieren lässt, da TALK-1 eine vernachlässigbar geringe Stimulierung zeigt und TASK-2 keine Regulation aufweist.

Unter den untersuchten Kanälen ist TRESK derjenige, der durch LC-CoA eine Inhibition zeigt (alle Daten werden im Kapitel 3.2.3 dargestellt).

Es lässt sich somit festhalten, dass es unter den K2P-Kanälen ein heterogenes Muster bezüglich ihrer Regulation durch langketziges Acyl-CoA gibt. Dieses unterscheidet sich von dem Muster bei K_{ir}-Kanälen, bei denen der inhibitorische Charakter überwiegt.

Des Weiteren ist zu bemerken, dass sich die untersuchten K2P-Kanäle im Gegensatz zu den K_{ir}-Kanälen hinsichtlich ihrer Regulation durch PIP₂ und LC-CoA weitestgehend kongruent verhalten, während alle K_{ir}-Kanäle durch PIP₂ stimuliert, jedoch abgesehen vom K_{ATP}-Kanal durch LC-CoA gehemmt werden.

Das kongruente Verhalten der LC-CoA- und PIP₂-Wirkung an den K2P-Kanälen legt die Vermutung nahe, dass sich der Wirkmechanismus beider Lipide ähnelt.

Wie oben bereits geschildert, konnte der durch PIP₂-vermittelte Wirkmechanismus bei K2P-Kanälen am TREK-1 gezeigt werden. Die elektrostatische Interaktion des negativ geladenen PIP₂ mit dem positiv geladenen proximalen C-Terminus des Ionenkanals ermöglicht eine Regulation.

Dass diese Wirkungsweise an K2P-Kanälen auch für LC-CoA gelten könnte, erhärten die Tatsachen, dass LC-CoA aufgrund seiner amphiphilen Struktur (Abb. 1.8) mit einer hydrophilen Kopfgruppe (drei Phosphatreste im Rahmen des ADP-Teilmoleküls) und einem hydrophoben Teil (Fettsäure) strukturelle Ähnlichkeiten zum PIP₂-Molekül aufweist und dass Fettsäuren allein keinen regulatorischen Einfluss auf die K2P-Kanäle haben (Abb. 3.18).

Zudem kann die LC-CoA-Wirkung durch Polylysin aufgehoben werden (Abb. 3.19), was die Ähnlichkeit zum PIP₂-Wirkungsmechanismus nahelegt. Auch die PIP₂-Wirkung am K2P-Kanal kann durch das kationische Molekül Polylysin (PolyK) rückgängig gemacht werden (Abb. 3.7) (Chemin et al., 2005), indem es mit hoher Affinität die negativ geladenen Phospholipide bindet und somit deren elektrostatische Interaktion mit dem positiv geladenen Abschnitt des Kanals hemmt (Huang et al., 1998, Lopes et al., 2002).

Des Weiteren konnte der elektrostatische Effekt von Oleoyl-CoA bereits an einem Kir-Kanal (K_{ATP}) beschrieben werden (Schulze et al., 2003). Wie Schulze et. al. zeigten, wirken LC-CoA und PIP₂ über denselben Mechanismus und dieselben Interaktionsbereiche (C- und N-Terminus) des K_{ATP} aktivierend.

Bei den anderen Kir-Kanälen mit gegensätzlichem Effekt von PIP₂ und LC-CoA konnte ebenso ein Zusammenhang deren Wirkungsweisen festgestellt werden. PIP₂ besitzt direkte Bindungsstellen am C-Terminus dieser Kir-Kanäle (Huang et al., 1998, Soom et al., 2001). Rapedius et. al. (2005) konnten darlegen, dass auch LC-CoA an die C-Terminus-Bereiche bindet und seine inhibitorische Wirkung durch Verdrängung von PIP₂ entfaltet, dass es also zur kompetitiven Hemmung kommt (Abb. 4.5).

Aufgrund der genannten Argumente ist eine elektrostatische Interaktion von LC-CoA am C-Terminus des K2P-Kanals anzunehmen, was zukünftige Experimente zeigen müssen.

Ob diese Interaktion mit denselben Aminosäuren, mit denen auch PIP₂ interagiert, erfolgt, kann durch Substitution der fünf positiven Aminosäuren im proximalen C-Terminus des TREK-1 (zum Beispiel durch Alanin) oder durch deren Deletion untersucht werden, da dabei der Kanal aktiv bleibt, jedoch komplett resistent bezüglich einer PIP₂-Aktivierung wird (Chemin et al., 2005). Sollte es hierbei zugleich zu einer LC-CoA-Resistenz kommen, wäre eine Interaktion von LC-CoA und PIP₂ mit denselben basischen Aminosäuren anzunehmen.

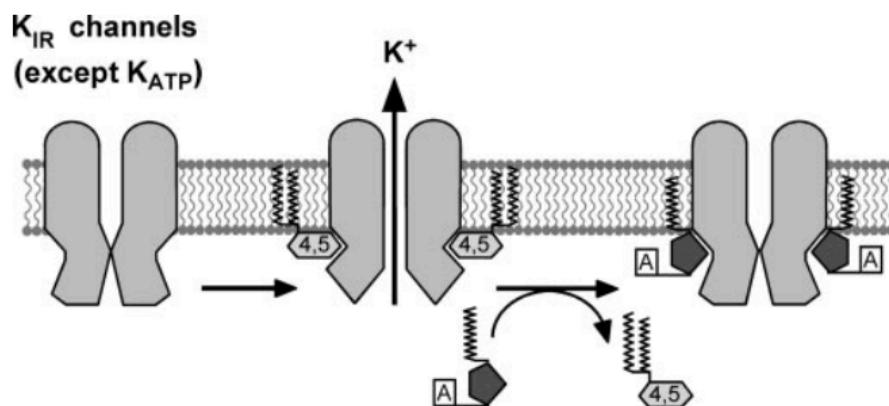


Abb. 4.5: Modell zur Veranschaulichung der Regulation von K_{IR}-Kanälen (außer K_{ATP}) durch PIP₂ und LC-CoA (Rapedius et al., 2005). Durch Bindung von PIP₂ (PI(4,5)P₂) wechseln die K_{IR}-Kanäle vom geschlossenen in den geöffneten Zustand. LC-CoA verdrängt PIP₂ von seiner Bindungsstelle, wodurch der Kanal wieder in den geschlossenen Zustand übergeht.

Bemerkenswerterweise gilt die eben beschriebene Kongruenz der PIP₂- und LC-CoA-Regulation nicht für TALK-2, der äußerst potent durch LC-CoA, jedoch nur schwach durch PIP₂ aktiviert wird (Abb. 3.9). Dieser eindrucksvolle Unterschied zwischen der Potenz der Oleoyl-CoA- und der PIP₂-Aktivierung muss einer Spezifität für Acyl-CoA des TALK-2 zu Grunde liegen. Inwieweit Molekülgrößen und damit Affinitätsunterschiede für diese beiden Lipidgruppen ursächlich sind, wird sich zeigen müssen.

Im Folgenden soll auf die Ergebnisse der Struktur-Funktionsbeziehungen eingegangen werden.

Dadurch dass Fettsäuren und Coenzym A keinen Effekt auf die Regulation von K2P-Kanälen zeigen (Abb. 3.18), sondern Acyl-CoA zwingend erforderlich ist, lässt sich folglich vermuten, dass elektrostatische Interaktionen von LC-CoA für die Wirkung eine entscheidende Rolle spielen müssen.

Diese Konstellation liegt auch bei K_{ir} -Kanälen vor (Rapedius et al., 2005). Von Rapedius et al. konnte zudem gezeigt werden, dass höchstwahrscheinlich das 3'-Ribosephosphat (markiert in Abb. 1.8) mit den basischen Aminosäuren des C-Terminus interagiert, während die Pyrophosphatgruppe als Teil der ADP-Einheit für diese Interaktionen nicht wichtig zu sein scheint. Ob die indizierte Phosphatgruppe auch für die Wirkung an K2P-Kanälen kritisch ist, könnte durch Synthese und Messung von beispielsweise Oleoyl-CoA_{dephospho}, einem Oleoyl-CoA-Molekül, dem die Phosphatgruppe am 3'-Ribosering fehlt, gelingen.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Potenz von LC-CoA von der Kettenlänge des Acylrests abhängt (Abb. 3.17). Myristoylsäure-gebundenes CoA zeigt kaum Aktivierung, während durch Verlängerung der Fettsäurekette eine Zunahme der Potenz sichtbar wird. Maximale Aktivierung zeigt Stearoyl-CoA. Dieser Anstieg der Potenz durch Zunahme der Fettsäurekettenlänge ist vereinbar mit den Daten zur Wirkung von LC-CoA an K_{ir} -Kanälen (Rapedius et al., 2005) und auch mit denen zur Wirkung am TRPV1-Kanal, einem Kationenkanal, der zur Gruppe der TRP-Kanäle zählt und neben PIP₂ ebenfalls durch LC-CoA aktiviert werden kann, vorausgesetzt Capsaicin ist anwesend (Yu et al., 2014). Als längste Fettsäure wurde in den eben genannten Studien jedoch Stearinäure (18 C-Atome) gewählt. Die in dieser Arbeit darüber hinausgehenden Fettsäuren mit 22 beziehungsweise 26 C-Atomen zeigen bemerkenswerterweise eine Abnahme in der Aktivierungspotenz, sodass sich die Wirkung im sehr langen Kettenlängen-Bereich verliert. Das unter den LC-CoA physiologisch am häufigsten vorkommende Stearoyl-CoA zeigt somit die stärkste Potenz.

Eine Erklärung, weshalb die Effektivität der Aktivierung von LC-CoA von der Struktur der Fettsäure abhängt, könnte darin liegen, dass sich die Acylkette in die Plasmamembran inkorporiert und dadurch das Kanalprotein allosterisch beeinflusst (Cohen Simonsen et al., 2003, Yu et al., 2014). Eine Konformation mit 18 Fettsäuren scheint dabei den besten Effekt zu haben, da eine Abnahme der Kettenlänge mit einer Abnahme der Hydrophobizität einhergeht und eine Zunahme mit sterischen Problemen verknüpft sein könnte.

Nicht nur die Kettenlänge des Acylrests hat Einfluss auf die Potenz der LC-CoA-Wirkung sondern auch der Grad der Sättigung. Es zeigte sich, dass LC-CoA, die eine

gesättigte Fettsäure enthalten, die stärkste Wirkung entfachen können. Durch Einfügen einer oder mehrerer Doppelbindungen in die Acylkette reduzierte sich der stimulatorische Effekt. Dieses Phänomen konnte auch von Yu et. al. (2014) am TRPV1 festgestellt werden.

Durch eine Abnahme der Sättigung der Fettsäure durch Einfügen von Doppelbindungen erhöht sich möglicherweise die Mobilität und nimmt die Lipophilität ab, was zu einer Abnahme in der Acylrest-Membraninteraktion führen könnte (Yu et al., 2014).

Schlussfolgernd besitzt Stearoyl-CoA wahrscheinlich die stärkste Wirkung, weil die gesättigte Stearinäure aufgrund ihres hohen Verteilungskoeffizienten zugunsten der lipophilen Phase die beste Fähigkeit zur Membraninteraktion aufweist (Ahrens und Craig, 1952).

4.3 Physiologische Relevanz der Regulation von K2P-Kanälen durch LC-CoA

LC-CoA besitzen eine hohe Relevanz im Metabolismus der Zellen unseres Körpers. Der Zusammenhang zwischen LC-CoA, Metabolismus und K2P-Kanal-Aktivität soll nun erläutert werden.

Nachdem Fettsäuren, im Blut an Albumin gebunden, von den Zellen aufgenommen worden sind, werden sie zur weiteren Verarbeitung durch die zytosolische Acyl-CoA-Synthetase über das Zwischenprodukt Acyladenylat (Acyl-AMP) zu Acyl-CoA aktiviert. Zur Energiegewinnung wird Acyl-CoA unter aeroben Bedingungen über den Carnitin-Shuttle ins Mitochondrium transportiert, um dort in die β -Oxidation eingeschleust und zu Acetyl-CoA abgebaut zu werden (Abb. 4.6). Die dabei entstehenden Reduktionäquivalente werden als NADH^++H^+ und FADH_2 in der Atmungskette oxidiert, um ATP zu erzeugen.

Eine Voraussetzung für den Einfluss von LC-CoA auf die K2P-Kanal-Aktivität ist in der Situation gegeben, in der es aufgrund von Veränderungen im Metabolismus zur Akkumulation von LC-CoA im Zytoplasma kommt, wodurch dessen zytosolische

Konzentration steigt und dadurch eine Aktivierung entsprechender K2P-Kanäle (TREK-1, TRAAK, TALK-2) möglich ist.

Eine derartige Konstellation tritt im Herzen unter hypoxämischen Bedingungen auf. Eine durch eine Ischämie beispielsweise im Rahmen eines Myokardinfarkts ausgelöste Hypoxie in Kardiomyozyten führt durch den Mangel an Sauerstoff zum Erliegen der β -Oxidation, da die in der β -Oxidation auf NAD und FAD übertragenden Reduktionsäquivalente in der Atmungskette nicht mehr oxidiert werden können (van der Vusse et al., 1992, Schulze, 2004). Nachfolgend wäre wegen der zytoplasmatischen Akkumulation von LC-CoA eine K2P-Kanal-Aktivierung denkbar. Eine Aktivierung kardialer Kaliumkanäle unter Ischämiebedingungen würde das Membranpotential stabilisieren und könnte eine funktionelle Bedeutung in der Kardioprotektion haben, indem zum einen der Triggerung möglicherweise maligner Herzrhythmusstörungen vorgebeugt wird und zum anderen die Lebenszeit von Kardiomyozyten durch den in dieser Situation geringeren Energieverbrauch günstig beeinflusst wird (van der Vusse et al., 1992, Liu et al., 2001, Schulze, 2004, Rapedius et al., 2005).

Da die durch LC-CoA aktivierbaren TREK-1- und TALK-2-Kanäle beide im Herzen exprimiert werden (Aimond et al., 2000, Terrenoire et al., 2001, Decher et al., 2001), müssen zukünftige Experimente an Kardiomyozyten zeigen, ob diese Kardioprotektion physiologisch relevant ist.

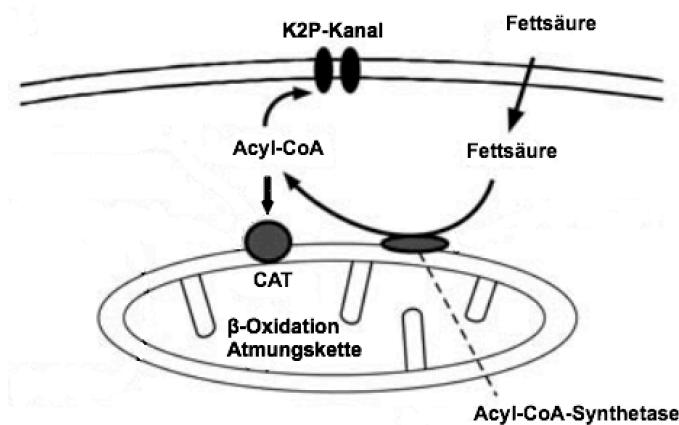


Abb. 4.6: LC-CoA und dessen Metabolismus (modifiziert nach Shumilina et. al. (2006)). Schematisches Diagramm des zellulären Fettsäure-Metabolismus. Nach Aufnahme der Fettsäure in die Zelle und Aktivierung zu Acyl-CoA durch die Acyl-CoA-Synthetase gelangt Acyl-CoA durch den Carnitin-Shuttle (Carnitin-Acyltransferase, CAT) ins Mitochondrium, um dort in die β -Oxidation eingespeist zu werden. Die entstehenden Reduktionsäquivalente werden in der Atmungskette für die ATP-Synthese benötigt. Zudem hat zytosolisches Acyl-CoA möglicherweise Einfluss auf die Aktivität von K2P-Kanälen.

Bisher wurde angenommen, dass eine intrazelluläre Azidose, die unter Ischämie aufgrund der anaeroben Bedingungen auftritt, und mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure oder Omega-3-Fettsäuren durch Stimulation von TREK-1 eine antiarrhythmische Wirkung hätten (Aimond et al., 2000, Xiao et al., 2008, Enyedi und Czirjak, 2010).

Außerdem besteht ein Zusammenhang zwischen dem Fettsäurestoffwechsel und dem Glukosemetabolismus. Es ist bekannt, dass hohe Glukosekonzentrationen zu einer verstärkten zytoplasmatischen LC-CoA-Akkumulation führen, da das entstehende Malonyl-CoA die Carnitin-Acyltransferase inhibiert, wodurch LC-CoA nicht mehr ins Mitochondrium aufgenommen werden kann (Prentki et al., 1992, Prentki et al., 2002). Dieses Enzym lässt sich ebenso pharmakologisch durch Etomoxir hemmen (Alam und Saggerson, 1998).

Dieser Zusammenhang kann ausgenutzt werden, um bei weiteren Experimenten in Kardiomyozyten durch Gabe von Glukose oder Etomoxir eine Akkumulation von LC-CoA künstlich hervorzurufen. Dies konnte bereits für K_{ATP} -Kanäle in CHO-Zellen gezeigt werden (Shumilina et al., 2006).

Eine weitere Bedeutung könnte im Hypothalamus existieren. Bestimmte hypothalamische Neurone, die Orexin und Hypocretin sezernieren, sind in der Lage, Glukose zu „fühlen“. Als Folge werden Kaliumkanäle aktiviert, was zur Hyperpolarisation der Zellen führt (Yamanaka et al., 2003, Burdakov et al., 2005). Orexin-Neurone sind an der Regulation von Appetit und Metabolismus beteiligt, spielen aber auch pathophysiologisch bei der Narkolepsie eine Rolle (Chemelli et al., 1999, Hara et al., 2001).

Auf der Suche nach der Entität der aktivierte Kaliumkanäle postulierten Burdakov et. al. (2006), dass TASK-3 für das Glukoseführen verantwortlich ist. Mit Hilfe von Knockout-Mäusen konnten jedoch Guyon et. al. (2009) diese These widerlegen. Des Weiteren konnten sie TREK-1 als Kandidat ausschließen.

Aufgrund des zuvor genannten Mechanismus der LC-CoA-Akkumulation durch erhöhte Glukosekonzentrationen und der in dieser Arbeit geschilderten Aktivierung von bestimmten K2P-Kanälen durch LC-CoA, sollte untersucht werden, ob dieser Mechanismus auch für die Orexin-produzierenden Neurone im Hypothalamus gilt. TALK-2-Kanäle, die durch LC-CoA aktiviert werden, werden auch im Gehirn exprimiert (Decher et al., 2001). Es sollte nun untersucht werden, ob die TALK-2- oder

auch die ebenfalls durch LC-CoA aktivierbaren TRAAK-Kanäle in den hypothalamischen Neuronen vorkommen und an der Hyperpolarisation bei Glukoseanstieg beteiligt sind.

Eine weitere physiologisch relevante Rolle könnte der Zusammenhang zwischen LC-CoA und dem endokrinen Pankreas aufzeigen. Es wird vermutet, dass die Aktivierung pankreatischer K_{ATP} -Kanäle in der Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 2 eine Rolle spielt, da es durch eine chronisch erhöhte Fettsäurekonzentration im Rahmen von etwa Adipositas zu einem vermehrten Anfall von LC-CoA kommt, was durch Stimulation der pankreatischen K_{ATP} -Kanäle zur Hyperpolarisation und folglich zu einer verminderten Insulinsekretion der β -Zellen des Pankreas führt (Larsson et al., 1996, Riedel et al., 2003, Branstrom et al., 2004).

Inwieweit bei diesem Mechanismus auch K2P-Kanäle beteiligt sind, sollten Experimente am TREK-1 in der Zukunft zeigen. Es ist seit Kurzem bekannt, dass TREK-1 im endokrinen Pankreas exprimiert wird und dass dieser Kanal durch die Veränderung des Membranpotentials mit in der Folge verändertem Calciumeinstrom die Stärke der Glukose-abhängigen Insulinsekretion beeinflusst (Hivelin et al., 2016). Schlussfolgernd könnte eine Aktivierung des pankreatischen TREK-1 durch LC-CoA eine verminderte Insulinsekretion bewirken und somit ebenso im Pathomechanismus des Diabetes mellitus Typ 2 involviert sein.

5. Zusammenfassung

Zwei-Poren-Domänen-Kaliumkanäle (K2P-Kanäle) stellen eine wichtige Kaliumkanalklasse in unserem Körper dar und sind entscheidend an der Regulation der zellulären Erregbarkeit beteiligt. Als polymodal regulierte Ionenkanäle nehmen sie eine zentrale Rolle in sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch relevanten Prozessen wie Neuroprotektion, Schmerz oder Herzrhythmusstörungen ein.

In dieser Arbeit wurde an rekombinanten K2P-Kanälen die Regulation dieser Kaliumkanalfamilie durch Pharmaka, Membranspannung und Membranlipide elektrophysiologisch untersucht.

Die Identifikation spezifischer pharmakologischer Aktivatoren der K2P-Kanäle als Hilfsmittel für die weitere Erforschung der Ionenkanäle stellt eine wichtige Aufgabe dar. Gegenwärtig fehlen jedoch diese Werkzeuge. Mit 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) und Drofenin konnte ich in dieser Arbeit erstmals zwei strukturell ähnliche pharmakologische Aktivatoren des TALK-2, einem Mitglied der TALK-Subfamilie, beschreiben. Diese könnten als Ausgangssubstanzen für die Entwicklung neuer Medikamente dienen.

Des Weiteren wurde für TALK-2-Kanäle eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber der Inhibition durch Tetrapentylammonium (TPA^+) für verschiedene Aktivierungsmechanismen gezeigt. Dies impliziert strukturelle Unterschiede im Bereich der TPA^+ -Bindungsstelle in Abhängigkeit vom Aktivierungsmechanismus. Die dynamische Veränderung der TPA^+ -Empfindlichkeit wird hier erstmals für einen Kaliumkanal beschrieben.

Die Resultate zur Spannungsaktivierung des TALK-2-Kanals bestätigen das Konzept der ionenabhängigen Aktivierung des Selektivitätsfilters in K2P-Kanälen, das in der Baukowitz-Arbeitsgruppe durch Schewe et. al. (2016) veröffentlicht wurde.

Eine besondere Relevanz stellt die Regulation von Ionenkanälen durch physiologisch vorkommende Produkte wie etwa Membranlipide dar. In dieser Arbeit wurde der Einfluss sowohl von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), dessen Wirkung auf

K_{2P}-Kanäle in der Literatur bereits bekannt ist, als auch von Acyl-Coenzym A (Acyl-CoA, LC-CoA) auf die K_{2P}-Kanäle untersucht.

Acyl-CoA stellen obligate Intermediärprodukte im Fettstoffwechsel dar und wurden als Regulatoren der K_{iR}-Kanäle bereits beschrieben. Ihre Bedeutung für die K_{2P}-Kanäle war bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit konnten sie als hochpotente endogene Aktivatoren einiger K_{2P}-Kanäle identifiziert werden. Die Wirkpotenz hing von der Länge und vom Grad der Sättigung der enthaltenen Fettsäure ab. Als Wirkmechanismus ist von einer elektrostatischen Interaktion von Acyl-CoA mit dem C-Terminus des K_{2P}-Kanals auszugehen. Zudem konnte innerhalb der K_{2P}-Familie hinsichtlich der PIP₂- und Acyl-CoA-Regulation ein heterogenes, jedoch weitestgehend kongruentes Muster festgestellt werden, das sich bemerkenswerterweise deutlich von demjenigen unterscheidet, das bislang an K_{iR}-Kanälen beschrieben wurde.

Um die physiologische sowie pathophysiologische Bedeutung der Regulation von K_{2P}-Kanälen durch die genannten Pharmaka und Membranlipide zu etablieren, bedarf es weiterer Forschung an zum Beispiel Herzmuskelzellen, Neuronen oder Zellen des endokrinen Pankreas. Interessante Fragestellungen wären hierbei, inwieweit eine durch Hypoxie ausgelöste Akkumulation von Acyl-CoA durch Öffnen von K_{2P}-Kanälen zur Kardioprotektion beiträgt, welche Rolle K_{2P}-Kanäle im Hypothalamus unter Bedingungen von Glukose-induzierter Acyl-CoA-Akkumulation im Rahmen der Appetitregulation spielen oder inwiefern eine Regulation von pankreatischen K_{2P}-Kanälen durch Acyl-CoA zum Pathomechanismus des Diabetes Mellitus Typ 2 beiträgt.

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- AHRENS, E. H., JR. & CRAIG, L. C. 1952. Separation of the higher fatty acids. *J Biol Chem*, 195, 299-310.
- AIMOND, F., RAUZIER, J. M., BONY, C. & VASSORT, G. 2000. Simultaneous activation of p38 MAPK and p42/44 MAPK by ATP stimulates the K⁺ current ITREK in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 275, 39110-6.
- ALAM, N. & SAGGERSON, E. D. 1998. Malonyl-CoA and the regulation of fatty acid oxidation in soleus muscle. *Biochem J*, 334 (Pt 1), 233-41.
- ALLOUI, A., ZIMMERMANN, K., MAMET, J., DUPRAT, F., NOEL, J., CHEMIN, J., GUY, N., BLONDEAU, N., VOILLEY, N., RUBAT-COUDERT, C., BORSOTTO, M., ROMEY, 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.
- ANAZCO, C., PENA-MUNZENMAYER, G., ARAYA, C., CID, L. P., SEPULVEDA, F. V. & NIEMEYER, M. I. 2013. G protein modulation of K2P potassium channel TASK-2 : a role of basic residues in the C terminus domain. *Pflugers Arch*, 465, 1715-26.
- ARMSTRONG, C. M. 1966. Time course of TEA(+) -induced anomalous rectification in squid giant axons. *J Gen Physiol*, 50, 491-503.
- ARMSTRONG, C. M. 1971. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J Gen Physiol*, 58, 413-37.
- BAGRIANTSEV, S. N., CLARK, K. A. & MINOR, D. L., JR. 2012. Metabolic and thermal stimuli control K(2P)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.
- BANG, H., KIM, Y. & KIM, D. 2000. TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K⁺ channel family. *J Biol Chem*, 275, 17412-9.

- BAUKROWITZ, T., SCHULTE, U., OLIVER, D., HERLITZE, S., KRAUTER, T., TUCKER, S. J., RUPPERSBERG, J. P. & FAKLER, B. 1998. PIP₂ and PIP as determinants for ATP inhibition of KATP channels. *Science*, 282, 1141-4.
- 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.
- 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.
- 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., VEYSSIÈRE, 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.
- BRANSTROM, R., ASPINWALL, C. A., VALIMAKI, S., OSTENSSON, C. G., TIBELL, A., ECKHARD, M., BRANDHORST, H., CORKEY, B. E., BERGGREN, P. O. & LARSSON, O. 2004. Long-chain CoA esters activate human pancreatic beta-cell KATP channels: potential role in Type 2 diabetes. *Diabetologia*, 47, 277-83.
- BRANSTROM, R., LEIBIGER, I. B., LEIBIGER, B., CORKEY, B. E., BERGGREN, P. O. & LARSSON, O. 1998. Long chain coenzyme A esters activate the pore-forming subunit (Kir6. 2) of the ATP-regulated potassium channel. *J Biol Chem*, 273, 31395-400.
- BROHAWN, S. G., CAMPBELL, E. B. & MACKINNON, R. 2013. Domain-swapped chain connectivity and gated membrane access in a Fab-mediated crystal of the human TRAAK K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 2129-34.

- 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.
- BROHAWN, S. G., SU, Z. & MACKINNON, R. 2014. Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 3614-9.
- BUCKLER, K. J., WILLIAMS, B. A. & HONORE, E. 2000. An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol*, 525 Pt 1, 135-42.
- BURDAKOV, D., GERASIMENKO, O. & VERKHRATSKY, A. 2005. Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *J Neurosci*, 25, 2429-33.
- BURDAKOV, D., JENSEN, L. T., ALEXOPOULOS, H., WILLIAMS, R. H., FEARON, I. M., O'KELLY, I., GERASIMENKO, O., FUGGER, L. & VERKHRATSKY, A. 2006. Tandem-pore K⁺ channels mediate inhibition of orexin neurons by glucose. *Neuron*, 50, 711-22.
- 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.
- CHANDY, K. G. 1991. Simplified gene nomenclature. *Nature*, 352, 26.
- CHATELAIN, F. C., BICHET, D., DOUGUET, D., FELICIANGELI, S., BENDAHOU, S., REICHOLD, M., WARTH, R., BARHANIN, J. & LESAGE, F. 2012. TWIK1, a unique background channel with variable ion selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 5499-504.
- CHATELAIN, F. C., BICHET, D., FELICIANGELI, S., LARROQUE, M. M., BRAUD, V. M., DOUGUET, D. & LESAGE, F. 2013. Silencing of the tandem pore domain halothane-inhibited K⁺ channel 2 (THIK2) relies on combined intracellular retention and low intrinsic activity at the plasma membrane. *J Biol Chem*, 288, 35081-92.
- CHEMELLI, R. M., WILLIE, J. T., SINTON, C. M., ELMQUIST, J. K., SCAMMELL, T., LEE, C., RICHARDSON, J. A., WILLIAMS, S. C., XIONG, Y., KISANUKI, Y., FITCH, T. E., NAKAZATO, M., HAMMER, R. E., SAPER, C. B. & YANAGISAWA, M. 1999. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, 98, 437-51.

- 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, H., CHATELAIN, F. C. & LESAGE, F. 2014. Altered and dynamic ion selectivity of K⁺ channels in cell development and excitability. *Trends Pharmacol Sci*, 35, 461-9.
- CHEN, X., TALLEY, E. M., PATEL, N., GOMIS, A., MCINTIRE, W. E., DONG, B., VIANA, F., GARRISON, J. C. & BAYLISS, D. A. 2006. Inhibition of a background potassium channel by Gq protein alpha-subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 3422-7.
- CHOE, S. 2002. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci*, 3, 115-21.
- CHVANOV, M., PETERSEN, O. H. & TEPIKIN, A. 2005. Free radicals and the pancreatic acinar cells: role in physiology and pathology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360, 2273-84.
- COHEN, A., BEN-ABU, Y., HEN, S. & ZILBERBERG, N. 2008. A novel mechanism for human K2P2.1 channel gating. Facilitation of C-type gating by protonation of extracellular histidine residues. *J Biol Chem*, 283, 19448-55.
- COHEN SIMONSEN, A., BERNCHOU JENSEN, U., FAERGEMAN, N. J., KNUDSEN, J. & MOURITSEN, O. G. 2003. Acyl-coenzyme A organizes laterally in membranes and is recognized specifically by acyl-coenzyme A binding protein. *FEBS Lett*, 552, 253-8.
- 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.
- CZIRJAK, G., TOTH, Z. E. & ENYEDI, P. 2004. The two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. *J Biol Chem*, 279, 18550-8.
- 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.
- DECHER, N., MAIER, M., DITTRICH, W., GASSENHUBER, J., BRUGGEMANN, A., BUSCH, A. E. & STEINMEYER, K. 2001. Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. *FEBS Lett*, 492, 84-9.
- DEENEY, J. T., PRENTKI, M. & CORKEY, B. E. 2000. Metabolic control of beta-cell function. *Semin Cell Dev Biol*, 11, 267-75.

- 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.
- DOUPNIK, C. A., DAVIDSON, N. & LESTER, H. A. 1995. The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol*, 5, 268-77.
- 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. *J Morphol*, 136, 153-79.
- 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., FINK, M., REYES, R., HEURTEAUX, C. & LAZDUNSKI, M. 1997. TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J*, 16, 5464-71.
- 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.
- ENYEDI, P. & CZIRJAK, G. 2010. Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev*, 90, 559-605.
- FAKLER, B., BRANDLE, U., GLOWATZKI, E., WEIDEMANN, S., ZENNER, H. P. & RUPPERSBERG, J. P. 1995. Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K⁺ channels is caused by intracellular spermine. *Cell*, 80, 149-54.
- FAN, Z. & MAKIELSKI, J. C. 1997. Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem*, 272, 5388-95.
- FELICIANGELI, S., CHATELAIN, F. C., BICHET, D. & LESAGE, F. 2014. The family of K channels: salient structural and functional properties. *J Physiol*.

- 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., ROMEY, 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.
- FONG, P., ARGENT, B. E., GUGGINO, W. B. & GRAY, M. A. 2003. Characterization of vectorial chloride transport pathways in the human pancreatic duct adenocarcinoma cell line HPAF. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285, C433-45.
- 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.
- FULLER, M. D., ZHANG, Z. R., CUI, G., KUBANEK, J. & MCCARTY, N. A. 2004. Inhibition of CFTR channels by a peptide toxin of scorpion venom. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287, C1328-41.
- GESTREAU, C., HEITZMANN, D., THOMAS, J., DUBREUIL, V., BANDULIK, S., REICHOLD, M., BENDAHOU, S., PIERSON, P., STERNER, C., PEYRONNET-ROUX, J., BENFRIHA, C., TEGTMEIER, I., EHNES, H., GEORGIEFF, M., LESAGE, F., BRUNET, J. F., GORIDIS, C., WARTH, R. & BARHANIN, J. 2010. Task2 potassium channels set central respiratory CO₂ and O₂ sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 2325-30.
- GIRARD, C., DUPRAT, F., TERRENOIRE, C., TINEL, N., FOSSET, M., ROMEY, 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.
- GLAUNER, K. S., MANNUZZU, L. M., GANDHI, C. S. & ISACOFF, E. Y. 1999. Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature*, 402, 813-7.
- GLOWATZKI, E., FAKLER, G., BRANDLE, U., REXHAUSEN, U., ZENNER, H. P., RUPPERSBERG, J. P. & FAKLER, B. 1995. Subunit-dependent assembly of inward-rectifier K⁺ channels. *Proc Biol Sci*, 261, 251-61.

- GOLDSTEIN, S. A., BAYLISS, D. A., KIM, D., LESAGE, F., PLANT, L. D. & RAJAN, S. 2005. International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 527-40.
- GRIBBLE, F. M., PROKS, P., CORKEY, B. E. & ASHCROFT, F. M. 1998. Mechanism of cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA. *J Biol Chem*, 273, 26383-7.
- GUYON, A., TARDY, M. P., ROVERE, C., NAHON, J. L., BARHANIN, J. & LESAGE, F. 2009. Glucose inhibition persists in hypothalamic neurons lacking tandem-pore K⁺ channels. *J Neurosci*, 29, 2528-33.
- 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.
- HARA, J., BEUCKMANN, C. T., NAMBU, T., WILLIE, J. T., CHEMELLI, R. M., SINTON, C. M., SUGIYAMA, F., YAGAMI, K., GOTO, K., YANAGISAWA, M. & SAKURAI, T. 2001. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*, 30, 345-54.
- HARTNESS, M. E., LEWIS, A., SEARLE, G. J., O'KELLY, I., PEERS, C. & KEMP, P. J. 2001. Combined antisense and pharmacological approaches implicate hTASK as an airway O(2) sensing K(+) channel. *J Biol Chem*, 276, 26499-508.
- HEITZMANN, D., DERAND, R., JUNGBAUER, S., BANDULIK, S., STERNER, C., SCHWEDA, F., EL WAKIL, A., LALLI, E., GUY, N., MENGLAL, 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.
- HEURTEAUX, C., GUY, N., LAIGLE, C., BLONDEAU, N., DUPRAT, F., MAZZUCA, M., LANG-LAZDUNSKI, L., WIDMANN, C., ZANZOUI, M., ROMEY, G. & LAZDUNSKI, M. 2004. TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J*, 23, 2684-95.
- HEURTEAUX, C., LUCAS, G., GUY, N., EL YACOUBI, M., THUMMLER, S., PENG, X. D., NOBLE, F., BLONDEAU, N., WIDMANN, C., BORSOTTO, M., GOBBI, G., VAUGEONIS, J. M., DEBONNEL, G. & LAZDUNSKI, M. 2006. Deletion of the background potassium

- channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci*, 9, 1134-41.
- HIBINO, H., INANOBE, A., FURUTANI, K., MURAKAMI, S., FINDLAY, I. & KURACHI, Y. 2010. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*, 90, 291-366.
- HILGEMANN, D. W., FENG, S. & NASUHOGLU, C. 2001. The complex and intriguing lives of PIP2 with ion channels and transporters. *Sci STKE*, 2001, re19.
- HILLE, B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*, Sunderland, USA, Sinauer.
- HIVELIN, C., BERAUD-DUFOUR, S., DEVADER, C., ABDERRAHMANI, A., MORENO, S., MOHA OU MAATI, H., DJILLANI, A., HEURTEAUX, C., BORSOTTO, M., MAZELLA, J. & COPPOLA, T. 2016. Potentiation of Calcium Influx and Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cell by the Specific TREK-1 Blocker Spadin. *J Diabetes Res*, 2016, 3142175.
- HO, K., NICHOLS, C. G., LEDERER, W. J., LYTTON, J., VASSILEV, P. M., KANAZIRSKA, M. V. & HEBERT, S. C. 1993. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature*, 362, 31-8.
- HODGKIN, A. L. & HUXLEY, A. F. 1947. Potassium leakage from an active nerve fibre. *J Physiol*, 106, 341-67.
- HOLMGREN, M., SMITH, P. L. & YELLEN, G. 1997. Trapping of organic blockers by closing of voltage-dependent K⁺ channels: evidence for a trap door mechanism of activation gating. *J Gen Physiol*, 109, 527-35.
- HONORE, E. 2007. The neuronal background K⁺P 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.
- HUANG, C. L., FENG, S. & HILGEMANN, D. W. 1998. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbetagamma. *Nature*, 391, 803-6.
- KAMB, A., TSENG-CRANK, J. & TANOUYE, M. A. 1988. Multiple products of the Drosophila Shaker gene may contribute to potassium channel diversity. *Neuron*, 1, 421-30.
- 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. & KIM, D. 2006. Mechanism of inhibition of TREK-2 (K2P10.1) by the Gq-coupled M3 muscarinic receptor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C649-56.
- 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.
- KANG, D., KIM, E.-J. & HAN, J. 2012. Direct Inhibitory Effect of Fluoxetine on TREK-2 Channel. *Biophys*, 102, 680a.
- KEMP, P. J., PEERS, C., LEWIS, A. & MILLER, P. 2004. Regulation of recombinant human brain tandem P domain K⁺ channels by hypoxia: a role for O₂ in the control of neuronal excitability? *J Cell Mol Med*, 8, 38-44.
- 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.
- KIM, D., CAVANAUGH, E. J., KIM, I. & CARROLL, J. L. 2009. Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K⁺ channel in rat carotid body glomus cells. *J Physiol*, 587, 2963-75.
- KIM, Y., BANG, H., GNATENCO, C. & KIM, D. 2001a. Synergistic interaction and the role of C-terminus in the activation of TRAAK K⁺ channels by pressure, free fatty acids and alkali. *Pflugers Arch*, 442, 64-72.
- KIM, Y., BANG, H. & KIM, D. 2000. TASK-3, a new member of the tandem pore K(+) channel family. *J Biol Chem*, 275, 9340-7.
- KIM, Y., GNATENCO, C., BANG, H. & KIM, D. 2001b. Localization of TREK-2 K⁺ channel domains that regulate channel kinetics and sensitivity to pressure, fatty acids and pHi. *Pflugers Arch*, 442, 952-60.
- KLINKE, R., PAPE, H.-C., KURTZ, A. & SILBERNAGL, S. 2010. *Physiologie*, Stuttgart, Thieme.
- KÖPFER, D. A., SONG, C., GRUENE, T., SHELDRICK, G. M., ZACHARIAE, U. & DE GROOT, B. L. 2014. Ion permeation in K(+) channels occurs by direct Coulomb knock-on. *Science*, 346, 352-5.
- KUBO, Y., BALDWIN, T. J., JAN, Y. N. & JAN, L. Y. 1993. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*, 362, 127-33.

- L'HOSTE, S., BARRIERE, H., BELFODIL, R., RUBERA, I., DURANTON, C., TAUC, M., POUJEOL, C., BARHANIN, J. & POUJEOL, P. 2007. Extracellular pH alkalinization by Cl-/HCO₃- exchanger is crucial for TASK2 activation by hypotonic shock in proximal cell lines from mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292, F628-38.
- LAFRENIERE, R. G., CADER, M. Z., POULIN, J. F., ANDRES-ENGUIX, I., SIMONEAU, M., GUPTA, N., BOISVERT, K., LAFRENIERE, F., MCLAUGHLAN, S., DUBE, M. P., MARCINKIEWICZ, M. M., RAMAGOPALAN, S., ANSORGE, O., BRAIS, B., SEQUEIROS, J., PEREIRA-MONTEIRO, J. M., GRIFFITHS, L. R., TUCKER, S. J., EBERS, G. & ROULEAU, G. A. 2010. A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat Med*, 16, 1157-60.
- LARSSON, O., DEENEY, J. T., BRANSTROM, R., BERGGREN, P. O. & CORKEY, B. E. 1996. Activation of the ATP-sensitive K⁺ channel by long chain acyl-CoA. A role in modulation of pancreatic beta-cell glucose sensitivity. *J Biol Chem*, 271, 10623-6.
- LESAGE, F., GUILLEMARE, E., FINK, M., DUPRAT, F., LAZDUNSKI, M., ROMEY, G. & BARHANIN, J. 1996. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J*, 15, 1004-11.
- LESAGE, F., MAINGRET, F. & LAZDUNSKI, M. 2000. Cloning and expression of human TRAAK, a polyunsaturated fatty acids-activated and mechano-sensitive K(+) channel. *FEBS Lett*, 471, 137-40.
- 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.
- LIU, C., AU, J. D., ZOU, H. L., COTTEN, J. F. & YOST, C. S. 2004. Potent activation of the human tandem pore domain K channel TRESK with clinical concentrations of volatile anesthetics. *Anesth Analg*, 99, 1715-22, table of contents.
- LIU, G. X., HANLEY, P. J., RAY, J. & DAUT, J. 2001. Long-chain acyl-coenzyme A esters and fatty acids directly link metabolism to K(ATP) channels in the heart. *Circ Res*, 88, 918-24.
- LIU, H., ENYEART, J. A. & ENYEART, J. J. 2007. Potent inhibition of native TREK-1 K⁺ channels by selected dihydropyridine Ca²⁺ channel antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*, 323, 39-48.
- LOPATIN, A. N., MAKHINA, E. N. & NICHOLS, C. G. 1995. The mechanism of inward rectification of potassium channels: "long-pore plugging" by cytoplasmic polyamines. *J Gen Physiol*, 106, 923-55.
- LOPES, C. M., ROHACS, T., CZIRJAK, G., BALLA, T., ENYEDI, P. & LOGOTHECIS, D. E. 2005. PIP2 hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K⁺ channels. *J Physiol*, 564, 117-29.
- LOPES, C. M., ZHANG, H., ROHACS, T., JIN, T., YANG, J. & LOGOTHECIS, D. E. 2002. Alterations in conserved Kir channel-PIP2 interactions underlie channelopathies. *Neuron*, 34, 933-44.
- 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.
- LU, Z., KLEM, A. M. & RAMU, Y. 2001. Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature*, 413, 809-13.
- MACKINNON, R. 2004. Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 43, 4265-77.
- MAINCRET, F., LAURITZEN, I., PATEL, A. J., HEURTEAUX, C., REYES, R., LESAGE, F., LAZDUNSKI, M. & HONORE, E. 2000. TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel. *EMBO J*, 19, 2483-91.
- MAINCRET, F., PATEL, A. J., LESAGE, F., LAZDUNSKI, M. & HONORE, E. 1999. Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J Biol Chem*, 274, 26691-6.

- 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. *J Biochem*, 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.
- MILLER, A. N. & LONG, S. B. 2012. Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel K2P1. *Science*, 335, 432-6.
- MILOSAVLJEVIC, N., DURANTON, C., DJERBI, N., PUECH, P. H., GOUNON, P., LAGADIC-GOSSMANN, D., DIMANCHE-BOITREL, M. T., RAUCH, C., TAUC, M., COUNILLON, L. & POET, M. 2010. Nongenomic effects of cisplatin: acute inhibition of mechanosensitive transporters and channels without actin remodeling. *Cancer Res*, 70, 7514-22.
- 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.
- MONAGHAN, K., BAKER, S. A., DWYER, L., HATTON, W. C., SIK PARK, K., SANDERS, K. M. & KOH, S. D. 2011. The stretch-dependent potassium channel TREK-1 and its function in murine myometrium. *J Physiol*, 589, 1221-33.
- MURBARTIAN, J., LEI, Q., SANDO, J. J. & BAYLISS, D. A. 2005. Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. *J Biol Chem*, 280, 30175-84.
- NAYAK, T. K., HARINATH, S., NAMA, S., SOMASUNDARAM, K. & SIKDAR, S. K. 2009. Inhibition of human two-pore domain K⁺ channel TREK1 by local anesthetic lidocaine: negative cooperativity and half-of-sites saturation kinetics. *Mol Pharmacol*, 76, 903-17.
- NEHER, E. & SAKMANN, B. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260, 799-802.
- NERNST, W. 1888. Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper. Theorie der Diffusion. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 613-637.
- NIEMEYER, M. I., CID, L. P., PENA-MUNZENMAYER, G. & SEPULVEDA, F. V. 2010. Separate gating mechanisms mediate the regulation of K2P potassium channel TASK-2 by intra- and extracellular pH. *J Biol Chem*, 285, 16467-75.

- 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.
- OLIVER, D., BAUKROWITZ, T. & FAKLER, B. 2000. Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur J Biochem*, 267, 5824-9.
- 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.
- PATEL, A. J., HONORE, E., MAINGRET, F., LESAGE, F., FINK, M., DUPRAT, F. & LAZDUNSKI, M. 1998. A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J*, 17, 4283-90.
- 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. & NICHOLS, C. G. 2003. Ligand-induced closure of inward rectifier Kir6.2 channels traps spermine in the pore. *J Gen Physiol*, 122, 795-804.
- PIECHOTTA, P. L. 2014. *The TPenA Binding Site in TREK-1 Channels*. Med. Diss., Jena.
- PIECHOTTA, P. L., RAPEDIUS, M., STANSFELD, P. J., BOLLEPALLI, M. K., EHRLICH, G., ANDRES-ENGUIX, I., FRITZENSCHAFT, H., DECHER, N., SANSON, M. S., TUCKER, S. J. & BAUKROWITZ, T. 2011. The pore structure and gating mechanism of K2P channels. *EMBO J*, 30, 3607-19.
- PONGS, O., KECSKEMETHY, N., MULLER, R., KRAH-JENTGENS, I., BAUMANN, A., KILTZ, H. H., CANAL, I., LLAMAZARES, S. & FERRUS, A. 1988. Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of Drosophila. *EMBO J*, 7, 1087-96.
- PRENTKI, M., JOLY, E., EL-ASSAAD, W. & RODUIT, R. 2002. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes*, 51 Suppl 3, S405-13.
- PRENTKI, M., VISCHER, S., GLENNON, M. C., REGAZZI, R., DEENEY, J. T. & CORKEY, B. E. 1992. Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem*, 267, 5802-10.

- 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.
- RAJAN, S., WISCHMEYER, E., XIN LIU, G., PREISIG-MULLER, R., DAUT, J., KARSCHIN, A. & DERST, C. 2000. TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J Biol Chem*, 275, 16650-7.
- 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.
- RAPEDIUS, M., SOOM, M., SHUMILINA, E., SCHULZE, D., SCHONHERR, R., KIRSCH, C., LANG, F., TUCKER, S. J. & BAUKROWITZ, T. 2005. Long chain CoA esters as competitive antagonists of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate activation in Kir channels. *J Biol Chem*, 280, 30760-7.
- REYES, R., DUPRAT, F., LESAGE, F., FINK, M., SALINAS, M., FARMAN, N. & LAZDUNSKI, M. 1998. Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney. *J Biol Chem*, 273, 30863-9.
- RIEDEL, M. J., BOORA, P., STECKLEY, D., DE VRIES, G. & LIGHT, P. E. 2003. Kir6.2 polymorphisms sensitize beta-cell ATP-sensitive potassium channels to activation by acyl CoAs: a possible cellular mechanism for increased susceptibility to type 2 diabetes? *Diabetes*, 52, 2630-5.
- ROHACS, T., LOPES, C. M., JIN, T., RAMDYA, P. P., MOLNAR, Z. & LOGOTHETIS, D. E. 2003. Specificity of activation by phosphoinositides determines lipid regulation of Kir channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 745-50.
- SABBADINI, M. & YOST, C. S. 2009. Molecular biology of background K channels: insights from K(2P) knockout mice. *J Mol Biol*, 385, 1331-44.
- SANDOZ, G., BELL, S. C. & ISACOFF, E. Y. 2011. Optical probing of a dynamic membrane interaction that regulates the TREK1 channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 2605-10.
- SANDOZ, G., DOUGUET, D., CHATELAIN, F., LAZDUNSKI, M. & LESAGE, F. 2009. Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 14628-33.

- SANO, Y., INAMURA, K., MIYAKE, A., MOCHIZUKI, S., KITADA, C., YOKOI, H., NOZAWA, K., OKADA, H., MATSUSHIME, H. & FURUICHI, K. 2003. A novel two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is localized in the spinal cord. *J Biol Chem*, 278, 27406-12.
- SCHEWE, M., NEMATIAN-ARDESTANI, E., SUN, H., MUSINSZKI, M., CORDEIRO, S., BUCCI, G., DE GROOT, B. L., TUCKER, S. J., RAPEDIUS, M. & BAUKROWITZ, T. 2016. A Non-canonical Voltage-Sensing Mechanism Controls Gating in K2P K(+) Channels. *Cell*, 164, 937-49.
- SCHIFFERER, M., FENG, S., STEIN, F., TISCHER, C. & SCHULTZ, C. 2015. Reversible chemical dimerizer-induced recovery of PIP levels moves clathrin to the plasma membrane. *Bioorg Med Chem*.
- 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.
- SCHULZE, D. 2004. *Die Modulation einwärtsgleichrichtender Kaliumkanäle durch PIP2 und Oleoyl-Coenzym A*. Med. Diss., Jena.
- SCHULZE, D., RAPEDIUS, M., KRAUTER, T. & BAUKROWITZ, T. 2003. Long-chain acyl-CoA esters and phosphatidylinositol phosphates modulate ATP inhibition of KATP channels by the same mechanism. *J Physiol*, 552, 357-67.
- SHUMILINA, E., KLOCKER, N., KORNIYCHUK, G., RAPEDIUS, M., LANG, F. & BAUKROWITZ, T. 2006. Cytoplasmic accumulation of long-chain coenzyme A esters activates KATP and inhibits Kir2.1 channels. *J Physiol*, 575, 433-42.
- SHYNG, S. L., CUKRAS, C. A., HARWOOD, J. & NICHOLS, C. G. 2000. Structural determinants of PIP(2) regulation of inward rectifier K(ATP) channels. *J Gen Physiol*, 116, 599-608.
- SOOM, M., SCHONHERR, R., KUBO, Y., KIRSCH, C., KLINGER, R. & HEINEMANN, S. H. 2001. Multiple PIP2 binding sites in Kir2.1 inwardly rectifying potassium channels. *FEBS Lett*, 490, 49-53.
- SWARTZ, K. J. 2004. Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nat Rev Neurosci*, 5, 905-16.
- TALLEY, E. M. & BAYLISS, D. A. 2002. Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (Kcnk9) potassium channels: volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action. *J Biol Chem*, 277, 17733-42.

- TEMPEL, B. L., PAPAZIAN, D. M., SCHWARZ, T. L., JAN, Y. N. & JAN, L. Y. 1987. Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of Drosophila. *Science*, 237, 770-5.
- TERRENOIRE, C., LAURITZEN, I., LESAGE, F., ROMEY, G. & LAZDUNSKI, M. 2001. A TREK-1-like potassium channel in atrial cells inhibited by beta-adrenergic stimulation and activated by volatile anesthetics. *Circ Res*, 89, 336-42.
- THUMMLER, S., DUPRAT, F. & LAZDUNSKI, M. 2007. Antipsychotics inhibit TREK but not TRAAK channels. *Biochem Biophys Res Commun*, 354, 284-9.
- TULLEUDA, A., COKIC, B., CALLEJO, G., SAIANI, B., SERRA, J. & GASULL, X. 2011. TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Mol Pain*, 7, 30.
- VAN DER VUSSE, G. J., GLATZ, J. F., STAM, H. C. & RENEMAN, R. S. 1992. Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev*, 72, 881-940.
- VANDENBERG, C. A. 1987. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 2560-4.
- WARTH, R., BARRIERE, H., MENETON, P., BLOCH, M., THOMAS, J., TAUC, M., HEITZMANN, D., ROMEO, E., VERREY, F., MENGUAL, R., GUY, N., BENDAHOU, S., LESAGE, F., POUJEOL, P. & BARHANIN, J. 2004. Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K⁺ channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 8215-20.
- WAXMAN, S. G. & ZAMPONI, G. W. 2014. Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nat Neurosci*, 17, 153-63.
- WILKENS, C. M. & ALDRICH, R. W. 2006. State-independent block of BK channels by an intracellular quaternary ammonium. *J Gen Physiol*, 128, 347-64.
- WOO, D. H., HAN, K. S., SHIM, J. W., YOON, B. E., KIM, E., BAE, J. Y., OH, S. J., HWANG, E. M., MARMORSTEIN, A. D., BAE, Y. C., PARK, J. Y. & LEE, C. J. 2012. TREK-1 and Best1 channels mediate fast and slow glutamate release in astrocytes upon GPCR activation. *Cell*, 151, 25-40.
- XIAO, Y. F., SIGG, D. C., UJHELYI, M. R., WILHELM, J. J., RICHARDSON, E. S. & IAIZZO, P. A. 2008. Pericardial delivery of omega-3 fatty acid: a novel approach to reducing myocardial infarct sizes and arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294, H2212-8.

- YAMAMOTO, M., HILGEMANN, D. H., FENG, S., BITO, H., ISHIHARA, H., SHIBASAKI, Y. & YIN, H. L. 2001. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin stress-fiber formation and inhibits membrane ruffling in CV1 cells. *J Cell Biol*, 152, 867-76.
- YAMANAKA, A., BEUCKMANN, C. T., WILLIE, J. T., HARA, J., TSUJINO, N., MIEDA, M., TOMINAGA, M., YAGAMI, K., SUGIYAMA, F., GOTO, K., YANAGISAWA, M. & SAKURAI, T. 2003. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*, 38, 701-13.
- YANG, J., JAN, Y. N. & JAN, L. Y. 1995. Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel. *Neuron*, 15, 1441-7.
- YELLEN, G. 2002. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419, 35-42.
- YU, Y., CARTER, C. R., YOUSSEF, N., DYCK, J. R. & LIGHT, P. E. 2014. Intracellular long-chain acyl CoAs activate TRPV1 channels. *PLoS One*, 9, e96597.
- ZAMMIT, V. A. 1999. The malonyl-CoA-long-chain acyl-CoA axis in the maintenance of mammalian cell function. *Biochem J*, 343 Pt 3, 505-15.
- ZHANG, Y. Y., SACKIN, H. & PALMER, L. G. 2006. Localization of the pH gate in Kir1.1 channels. *Biophys J*, 91, 2901-9.
- 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*.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Schematische Darstellung der Plasmamembran mit einem Ionenkanal	1
	[modifiziert nach (Waxman und Zamponi, 2014)]	
Abb. 1.2	Strom-Spannungskurve eines Ionenkanals.....	3
	[modifiziert nach (Fuller et al., 2004)]	
Abb. 1.3	Patch-Clamp-Konfigurationen.....	5
	[aus (Klinke et al., 2010)]	
Abb. 1.4	Aufbau der drei Kaliumkanalklassen.....	7
	[aus (Klinke et al., 2010)]	
Abb. 1.5	Dendrogramm der menschlichen K2P-Kanäle.....	8
	[nach (Enyedi und Czirjak, 2010)]	
Abb. 1.6	Selektivitätsfilter bei Kaliumkanälen am Beispiel vom KcsA.....	10
	[modifiziert nach (Choe, 2002)]	
Abb. 1.7	Strukturformel von PIP ₂	15
	[nach (Schifferer et al., 2015)]	
Abb. 1.8	Struktur von LC-CoA.....	16
	[nach (Rapedius et al., 2005)]	
Abb. 1.9	Modell der TASK-2-Funktion im proximalen Tubulus der Niere.....	19
	[nach (Warth et al., 2004)].	
Abb. 2.1	Gelelektrophorese.....	23
Abb. 3.1	Messung von TALK-2-Kanälen unter Standardbedingungen und Aktivierung durch alkalischen extrazellulären pH.....	30
Abb. 3.2	Aktivierung von TALK-2-Kanälen durch alkalischen intrazellulären pH.....	31
Abb. 3.3	Aktivierung von TALK-2-Kanälen durch Membranspannung und deren Verstärkung durch Ersetzen der intrazellulären Kaliumionen durch Rubidiumionen.....	32
Abb. 3.4	Vergleich von TALK-2 WT und TALK-2 T116C.....	34
	[nach (Brohawn et al., 2013)]	
Abb. 3.5	Neue pharmakologische Aktivatoren des TALK-2.....	36

Abb. 3.6	TPA ⁺ -Sensitivität des TALK-2 hängt vom Aktivierungsmechanismus ab.....	38
Abb. 3.7	Regulation von TREK-1 durch PIP ₂ und Polylysin.....	40
Abb. 3.8	Regulation von TREK-1 durch Oleoyl-CoA.....	42
Abb. 3.9	Regulation von TALK-2 durch Oleoyl-CoA und PIP ₂	43
Abb. 3.10	Aktivierung von TALK-2 durch Oleoyl-CoA im Vergleich zur Ausgangssituation und zur Rubidiumaktivierung im Rampenprotokoll...	43
Abb. 3.11	Dosis-Wirkungs-Beziehung von Oleoyl-CoA am TALK-2.....	44
Abb. 3.12	Aktivierung von TALK-2 durch Oleoyl-CoA im einmikromolaren beziehungsweise submikromolaren Bereich.....	44
Abb. 3.13	Regulation von K2P-Kanälen durch Oleoyl-CoA und PIP ₂	47
Abb. 3.14	Regulation von K2P-Kanälen durch Oleoyl-CoA und PIP ₂	48
Abb. 3.15	Regulation der K2P-Kanäle durch Membranlipide im Vergleich.....	49
Abb. 3.16	Grad der Sättigung von LC-CoA bestimmt Maß der Aktivierung beim TALK-2.....	51
Abb. 3.17	Kettenlänge von LC-CoA bestimmt Maß der Aktivierung beim TALK-2.....	53
Abb. 3.18	Wirkung von Coenzym A und Ölsäure am TALK-2.....	54
Abb. 3.19	Wirkung von Polylysin (PolyK) nach Oleoyl-CoA-Aktivierung am TALK-2.....	54
Abb. 4.1	Schematische Darstellung einer TREK-2-Untereinheit.....	57
	[nach (Zhuo et al., 2015)]	
Abb. 4.2	TPA ⁺ -Bindung an K2P-Kanälen.....	58
	[nach (Piechotta et al., 2011)]	
Abb. 4.3	Schematische Darstellung des TPA ⁺ -Blocks von TALK-2 und TREK-1 im Vergleich.....	59
Abb. 4.4	Regulationsmechanismus von PIP ₂	62
	[nach (Sandoz et al., 2011)]	
Abb. 4.5	Modell zur Veranschaulichung der Regulation von K _{iR} -Kanälen (außer K _{ATP}) durch PIP ₂ und LC-CoA.....	64
	[nach (Rapedius et al., 2005)]	
Abb. 4.6	LC-CoA und dessen Metabolismus.....	67
	[modifiziert nach (Shumilina et al., 2006)]	

6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Bezeichnung der K2P-Subfamilien.....	9
Tab. 2	Auflistung der GenBank-Accession-Number (Inventarisierungsnummer), des verwendeten Expressionsvektors und dessen Resistenz-Gen für jede in dieser Arbeit verwendeten Ionen-kanal-DNA.....	23

6.4 Publikationen

Jürs BC, Schewe M, Nematian E & Baukrowitz T. 2015. Novel insight into the regulation of TALK-2 (TASK-4) channels by membrane voltage, intracellular ions and pharmacological compounds. 94th Annual Meeting of the German Physiological Society, 05.-07.03.2015, Magdeburg (Poster)

Tegtmeier M, Schulz F, Schewe M, Musinszki M, Jürs BC, Cordeiro S & Baukrowitz T. 2016. Pharmacological activation of K2P channels. 95th Annual Meeting of the German Physiological Society, Lübeck, 03.-05.03.2016 (Poster)

Jürs BC & Baukrowitz T. 2017. Regulation of K2P channels by acyl coenzyme A esters – Implications for a novel cardioprotective mechanism. 96th Annual Meeting of the German Physiological Society, Greifswald, 16.-18.03.2017 (Poster)

Riel EB, Jürs BC, Langer J, Schewe M & Baukrowitz, T. 2019. A restricted QA+ blocker accessibility of TALK-2 K2P channels uncovers a structural constriction at the inner pore entrance. 7th Symposium of the Young Physiologists, Nürnberg, 14.-15.03.2019 (Poster)

Riel EB, Jürs BC, Langer J, Musinszki M, Cordeiro S, Rinné S, Decher N, Schewe M & Baukrowitz T. 2020. Characterisation of the Versatile Gating Behaviour in TALK-2 K2P Channels. Biophysical Journal, 118(3):269a (Poster)

Schewe M, Riel EB, Rinné S, Kopec W, Langer J, Lindemann P, Jürs BC, Nazaré M, de Groot B, Decher N & Baukrowitz T. 2021. Structural Basis for Gating of the Two-Pore Domain K⁺ (K2P) Channels TASK-1 and TALK-2. Biophysical Journal. 120(3):289a. (Vortrag)

Riel EB*, Jürs BC*, Cordeiro S, Musinszki M, Schewe M & Baukrowitz T. 2022. The versatile regulation of K2P channels by polyanionic lipids of the phosphoinositide and fatty acid metabolism. J Gen Physiol, 154 (2): e202112989 (Originalarbeit)

*geteilte Erstautorenschaft

6.5 Eidestattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratsschlägen meines Betreuers und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich keine anderen als die in der Arbeit aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat, weder ganz noch in Teilen.

Kiel, 15.09.2021

Björn Christian Jürs, Verfasser

6.6 Danksagung

Als Erstes möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Baukrowitz für die herausragende Betreuung und die enorme Unterstützung im Verlauf meiner Arbeit bedanken.

Ich bin sehr dankbar, dass ich diese interessante Arbeit bei ihm in der Arbeitsgruppe anfertigen durfte, dass seine Tür stets offen war für mich und er mir als wissenschaftlicher Mentor in jeder Situation zur Seite stand.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Insbesondere Herr Prof. Dr. Markus Bleich unterstützte mich mit wertvollen Ratschlägen.

Ein großer Dank gilt der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Thomas Baukrowitz für die kollegiale Zusammenarbeit und die sehr nette und entspannte Arbeitsatmosphäre.

Dr. Marcus Schewe und Dr. Ehsan Nematian-Ardestani möchte ich hier ganz besonders hervorheben. Ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und ihr Engagement und Ehrgeiz, für alle Probleme eine Lösung zu finden, sind sicherlich nicht selbstverständlich. Vielen Dank!

Weiterhin möchte ich mich beim Team um Ria Neumann und Michaela Unmack für die hervorragenden Oozyten und Lösungen bedanken, bei Dr. Hariolf Fritzenschaft und Dr. Marianne Musinszki für ihre großartige Unterstützung in der Molekularbiologie, bei Dr. Friederike Schulz, Dr. Harald Wiese und Ingo Klein für ihre Hilfe bei technischen und experimentellen Fragen und bei Dr. Sönke Cordeiro für seine Hilfe beim Einstieg in die wissenschaftliche Tätigkeit.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, danken. Für ihre moralische Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen im Verlauf meines Studiums und meiner Doktorarbeit werde ich immer dankbar sein.