

Aus dem Physiologischen Institut

**(Direktoren: Prof. Dr. Thomas Baukrowitz, Prof. Dr. Markus Bleich
und Prof. Dr. Peer Wulff)**

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Inhibition von TRESK K_{2P} -Kanälen durch Pharmaka und endogene Lipide

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

ÜMIT MERT

aus Gaziantep

Kiel 2022

1. **Berichterstatter:** Prof. Dr. Thomas Baukrowitz
2. **Berichterstatter:** Prof. Dr. Peer Wulff

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2023

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 09.05.2023

gez.: Prof. Dr. Thomas Baukrowitz
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung	1
1.1. Bedeutung und Einteilung von Kaliumkanälen	1
1.2. K ₂ P-Kanäle	4
1.2.1. Aufbau und Struktur von K ₂ P-Kanälen	5
1.2.2. Die Rolle des SF beim Schaltverhalten.....	6
1.3. Der TRESK K ₂ P-Kanal und seine Regulation	8
1.3.1. Expressionsmuster	8
1.3.2. Die pathophysiologische Rolle von TRESK K ₂ P-Kanälen	8
1.3.3. Strukturelle Besonderheiten des TRESK K ₂ P-Kanals	9
1.3.4. Regulation durch Ca ²⁺ und Proteininteraktionen.....	9
1.3.5. Pharmakologische Regulation	11
1.4. Motivation und Ziel der Arbeit.....	12
2. Material und Methoden	13
2.1. cRNA-Synthese und Mutagenese	13
2.2. Oozyten als Expressionssystem.....	14
2.2.1. Oozytenpräparation	14
2.2.2. cRNA-Injektion und die Expression in Oozyten.....	14
2.3. Elektrophysiologische Messungen	15
2.3.1. Die Patch-clamp Methode	15
2.3.2. Durchführung der elektrophysiologischen Messungen	16
2.4. Datenaufnahme und Statistik	18
2.5. Verwendete Chemikalien und Lösungen.....	19
2.5.1. Verwendete Chemikalien	19
2.5.2. Verwendete Lösungen.....	20
3. Ergebnisse	23
3.1. Inhibition der TRESK K ₂ P-Kanäle durch bekannte und neue Modellsbstanzten.....	23
3.1.1. Inhibition durch quaternäre Ammoniumverbindungen (QA)	23
3.1.2. Inhibition durch Chlorpromazin.....	25

3.1.3.	Inhibition durch BL-1249	26
3.1.4.	Wechselwirkung zwischen quartären Ammoniumverbindungen, Chlorpromazin und BL-1249	27
3.1.5.	Wirkung von Porenmutationen auf die Inhibitionseffekte von quartären Ammoniumverbindungen, Chlorpromazin und BL-1249.....	29
3.2.	Inhibition der TRESK K ₂ P-Kanäle durch endogene Lipide	31
3.2.1.	Inhibition durch endogene Lipide.....	31
3.2.2.	Wechselwirkungen zwischen quartären Ammoniumverbindungen und endogenen Lipiden	32
3.2.3.	Der Einfluss von Porenmutationen auf die Inhibition von endogenen Lipiden..	34
3.3.	Strukturelle Besonderheiten der Inhibitionsmechanismen bei den TRESK K ₂ P-Kanälen.....	36
3.3.1.	Die Bedeutung des SF für die Inhibition durch quartäre Ammoniumverbindungen, Chlorpromazin und BL-1249.....	36
3.3.2.	Bedeutung des SF für die Inhibition durch endogene Lipide.....	38
4.	Diskussion.....	40
4.1.	Die Wirkung von Pharmaka auf den TRESK K ₂ P-Kanal	40
4.2.	Die Wirkung von endogenen Lipiden auf den TRESK K ₂ P-Kanal.....	42
4.3.	Der Effekt von Inhibitoren auf die F145A/F352A-TRESK K ₂ P-Kanalmutante	43
4.4.	Der Wirkmechanismus von Inhibitoren am TRESK K ₂ P-Kanal	45
5.	Zusammenfassung.....	49
6.	Summary.....	51
7.	Quellenverzeichnis.....	53
8.	Danksagung	59
9.	Eidesstattliche Erklärung.....	60

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
AEA	Anandamid
	(5,6,7,8-Tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl]-amin
BL-1249	
c	Ionenkonzentration
C-Terminus	Proteinende, welches eine Carboxylgruppe aufweist
CPZ	Chlorpromazin
DiC8	Dioctanoyl-sn-glycerol
	Mittlere effektive Wirkstoffkonzentration, die zu einem halbmaximalen aktivierenden Effekt führt
EC ₅₀	
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N,N',N'-tetraessigsäure
H	Hill-Koeffizient
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinylethansulfonsäure
I	Makroskopischer Strom
	Mittlere effektive Wirkstoffkonzentration, die zu einem halbmaximalen inhibitorischen Effekt führt
IC ₅₀	
K _{2P}	Zwei-Porendomänen Kaliumkanal
K _{Ca2+}	Kalzium-aktivierter Kaliumkanal
KcsA	Streptomyces lividans-Kaliumkanal
K _{ir}	Einwärts-gleichrichtender Kaliumkanal
K _V	Spannungsregulierter Kaliumkanal
kΩ	Kiloohm
LcCoA	Langkettiges Acyl-Coenzym A
mM	Millimol
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N-Terminus	Proteinende, welches eine Aminogruppe aufweist
nA	Nanoampere (10 ⁻⁹ Ampere)

NMDG	N-Methyl-D-glucamin
NSAIDs	nichtsteroidales Antirheumatikum
PD	Porendomäne
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
QA-Ionen	Quaternäre Ammoniumionen
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SF	Selektivitätsfilter
TALK	TWIK-related alkaline pH-activated K ⁺ -Kanal
TASK	TWIK-related acid sensing K ⁺ -Kanal
TButA	Tetrabutylammonium
TEA	Tetraethylammonium
THIK	Halothane-inhibited K ⁺ -Kanal
TMD	Transmembrandomäne
TPenA	Tetrapentylammoniumbromid
TProA	Tetrapropylammonium
TRAAK	TWIK-related arachidonic acid-stimulated K ⁺ -Kanal
TREK	TWIK-related K ⁺ -Kanal
TRESK	TWIK-related spinal cord K ⁺ -anal
TRPV	Transient receptor potential Kationkanal Subfamilie V
TWIK	Weak inward rectifying K ⁺ -Kanal
V	Volt
WT	Wildtyp
	Konz. der applizierten Substanz für einen halbmaximalen
X _{1/2}	Effekt
x _i	Messwert
μM	Mikromol

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Stammbaum der kaliumleitenden Ionenkanäle
- Abbildung 2 Dendrogramm der K_{2P} -Kanäle
- Abbildung 3 Struktureller Aufbau der K_{2P} -Kanäle
- Abbildung 4 Kristallographische Darstellung des SF und der Ionenleitung bei
Kaliumkanälen am Beispiel von KcsA
- Abbildung 5 Darstellung der phosphorylierungsabhängigen TRESK K_{2P} -Kanal-
regulation
- Abbildung 6 Darstellung der vier unterschiedlichen Patch-clamp Konfigurationen
- Abbildung 7 Strukturformeln der verwendeten QA-Ionen
- Abbildung 8 Einfluss von QA-Ionen auf den TRESK K_{2P} -Kanal
- Abbildung 9 Einfluss von CPZ auf den TRESK K_{2P} -Kanal
- Abbildung 10 Auswirkung von BL-1249 auf den TRESK K_{2P} -Kanal
- Abbildung 11 Exemplarische Messung der Wechselwirkung zwischen TEA und CPZ
- Abbildung 12 Konkurrenz zwischen QA-Ionen und CPZ
- Abbildung 13 Konkurrenz zwischen QA-Ionen und BL-1249
- Abbildung 14 Einfluss von QA-Ionen (TEA, TButA), CPZ und BL-1249 auf die
TRESK-F145A/F352A-Doppelmutante
- Abbildung 15 Strukturformeln der untersuchten endogenen Lipide
- Abbildung 16 Inhibition von TRESK K_{2P} -Kanälen durch Lipide
- Abbildung 17 Exemplarische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen TEA
und AA
- Abbildung 18 Konkurrenz zwischen QA-Ionen (TEA und TButA) und endogenen
Lipiden (AA, AEA und DiC8)

- Abbildung 19 Der Einfluss von endogenen Lipiden (AA, AEA und DiC8) auf die TRESK-F145A/F352A-Doppelmutante
- Abbildung 20 Die Auswirkungen von TEA, TButA, CPZ und BL-1249 auf die TRESK-T116C-Mutante
- Abbildung 21 Der Einfluss von TEA, TButA, CPZ und BL-1249 auf den TRESK-WT K_{2P} -Kanal und die TRESK-T116C-Mutante
- Abbildung 22 Auswirkungen von AA, AEA und DiC8 auf die TRESK-T116C-Mutante
- Abbildung 23 Darstellung der BL-1249-Bindungsstelle im TREK-2 K_{2P} -Kanal im Vergleich mit THexA und TEA
- Abbildung 24 Schematische Darstellung des allosterischen Inhibitionsmechanismus bei einem TRESK K_{2P} -Kanal
- Abbildung 25 Schematische Darstellung der Bindungsstellen der Porenblocker (lila) und der allosterischen Blocker (rot) im Vergleich

1. Einleitung

1.1. Bedeutung und Einteilung von Kaliumkanälen

Jede Zelle des menschlichen Körpers ist von einer Lipiddoppelschicht umgeben, die als Zellmembran bezeichnet wird. Die Zellmembran grenzt den Intrazellulärraum vom Extrazellulärraum ab und bildet durch ihre Hydrophobizität ein Hindernis für den Austausch bestimmter essenzieller Bestandteile, einschließlich wichtiger Ionen wie Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Cl^- . Gase und lipidlösliche Substanzen können hingegen die Membran ungehindert durch Diffusion passieren.

Zahlreiche zelluläre Prozesse vom Elektrolyttransport durch die Epithelien bis zur Erzeugung elektrischer Signale in den Neuronen hängen jedoch vom Ionenfluss durch die Membran ab. Bei den Ionenkanälen handelt es sich um Membranproteine, die den Ionenfluss zwischen der Außen- und Innenseite der Zellmembran ermöglichen (Choe, 2002).

Dabei werden die Kaliumkanäle sowohl in erregbaren als auch nicht erregbaren Zellen exprimiert. Die intrazelluläre Kaliumionen-Konzentration liegt unter physiologischen Bedingungen um das 40-Fache höher als die extrazelluläre. Das Ruhemembranpotential als das Membranpotential von erregbaren Zellen in Ruhe hängt hauptsächlich vom transmembranalen K^+ -Konzentrationsgradienten ab. Zu den unterschiedlichen Funktionen der Kaliumkanäle gehören etwa die Ausschüttung von Neurotransmittern und Hormonen, die Regulation der neuronalen und muskulären Erregbarkeit, die Regulation des Zellvolumens und die Regulation der Kaliumhomöostase (Lesage und Lazdunski, 2000).

Es gibt sowohl homo- als auch heterooligomere Kaliumkanäle, was davon abhängt, ob der funktionelle Kaliumkanal aus mehreren gleichen oder verschiedenen α -Untereinheiten besteht. Die Kaliumkanäle werden anhand der strukturellen und funktionellen Eigenschaften in vier große Familien eingeteilt, nämlich die spannungsabhängigen K_v -Kanäle, die einwärts gleichrichtenden K_{ir} -Kanäle, die Calcium-aktivierten $\text{K}_{\text{Ca}^{2+}}$ -Kanäle und die Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle (K_{2p} -Kanäle), bei denen die α -Untereinheiten über unterschiedlich viele Transmembrandomänen verfügen (Lu et al., 2001; Choe, 2002).

Die erste Kristallstruktur eines Ionenkanals wurde mit den Methoden der Röntgenstrukturanalyse für den bakteriellen Kaliumkanal KcsA bestimmt (Doyle et al., 1998).

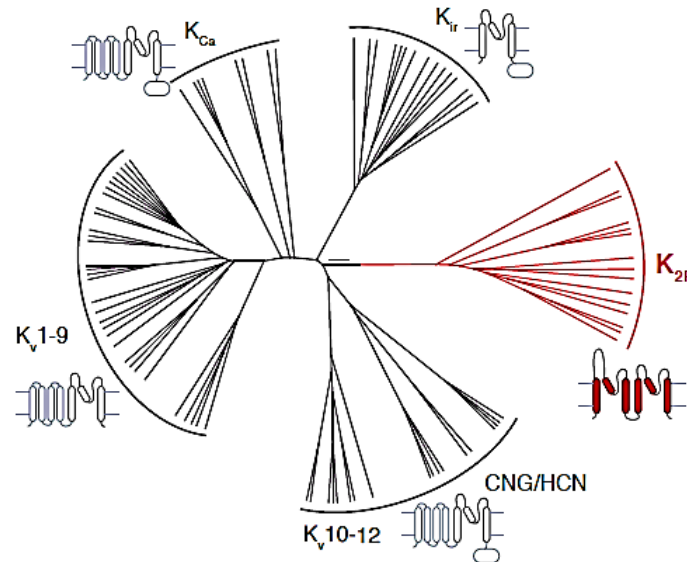


Abbildung 1: Stammbaum der kaliumleitenden Ionenkanäle. Dargestellt werden die einwärts gleichrichtenden (K_{ir}), die Ca^{2+} -aktivierten (K_{Ca2+}), die spannungsregulierten (K_v), die durch zyklische Nukleotide aktivierbaren (CNG/HCN) und die Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle. Für jede Familie wird jeweils eine Untereinheit dargestellt, wobei die K_{2P} -Kanäle rot hervorgehoben werden (modifiziert nach (Brohawn et al., 2012)).

K_v-Kanäle

Es sind 12 Subfamilien der spannungsabhängigen K_v -Kanäle bekannt (Gutman et al., 2005), die jeweils aus vier Monomeren bestehen, die wiederum aus sechs Transmembrandomänen (TM) und einer Porendomäne (P) zusammengesetzt sind. Die Porendomäne ist dabei zwischen TM5 und TM6 lokalisiert (Pongs et al., 1988). Durch die Tetramerisierung werden die vier P-Domänen zusammengefügt und bilden dann eine Kanalpore (Kamb et al., 1988; Pongs et al., 1988).

Die spannungsabhängigen K_v -Kanäle werden durch eine Änderung des Membranpotentials reguliert. Das S4-Segment, das über mehrere positiv geladene Aminosäuren verfügt, fungiert als Spannungssensor, der sich bei einer Depolarisation in der Richtung des Extrazellulärraums bewegt (Cha et al., 1999). Dabei kommt es zu einer Konformationsänderung, die zu einer mechanisch gekoppelten Kanalöffnung führt und so eine Signalweiterleitung über Aktionspotentiale ermöglicht (Swartz, 2004).

K_{ir}-Kanäle

Auch die einwärts gleichrichtenden K_{ir}-Kanäle werden wie die K_v-Kanäle in unterschiedliche Subgruppen eingeteilt und bilden ebenfalls Tetramere (Doupnik et al., 1995). Hinsichtlich ihrer Mediatoren und der Eigenschaften der Ionenleitung werden die K_{ir}-Kanäle in sieben Subfamilien unterteilt (Hibino et al., 2010). Sie bestehen aus zwei Transmembrandomänen und einer Porenregion, die die beiden Transmembrandomänen verknüpft (Ho et al., 1993; Kubo et al., 1993).

K_{ir}-Kanälen leiten bei gegenüber dem Umkehrpotential positiven Spannungen Kaliumionen in die Auswärtsrichtung und führen dadurch zu einer Hyperpolarisation der Zelle. Sie werden durch intrazelluläre positiv geladene Ionen wie Mg²⁺ und Polyamine wie Spermidin blockiert, wenn die Membranpotentiale gegenüber dem Umkehrpotential positiv sind (Ficker et al., 1994; Oliver et al., 2000), was zu einer Stabilisierung des Ruhemembranpotentials und zur charakteristischen rektifizierenden Wirkung auf den Kaliumstrom führt (Matsuda et al., 1987; Vandenberg, 1987).

K_{Ca}²⁺-Kanäle

In den 1970er Jahren wurden Calcium-aktivierte Kaliumkanäle in Zellen nachgewiesen (Meech, 1972) und in drei Gruppen eingeteilt, nämlich in „small conductance“ (SK), „intermediate conductance“ (IK) und „big conductance“ (BK) Kanäle. Dabei bestehen die SK- und IK-Kanäle aus sechs Transmembrandomänen, die spannungsabhängig und bei niedrigen intrazellulären Konzentrationen direkt durch Calciumionen aktiviert werden. Im Unterschied dazu bestehen die BK-Kanäle aus 7 Transmembrandomänen. In den Neuronen sind die BK-Kanäle mit den Calciumkanälen kolokalisiert und für die Regulation der Transmitterfreisetzung zuständig (Wei et al., 2005; Maljevic und Lerche, 2013).

1.2. K_{2P}-Kanäle

K_{2P}-Kanäle kommen sowohl im Tierreich als auch in Pflanzen vor. Während man diese Kanäle zunächst nur für passive „Leckkanäle“ hielt, konnte mittlerweile nachgewiesen werden, dass sie auf sehr komplexe Weise reguliert werden und wichtige funktionelle Aufgaben im Zentralnervensystem, im Herzen, in den Blutgefäßen, den Nieren, den endokrinen und exokrinen Drüsen und vielen anderen Organen übernehmen.

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind 15 K_{2P}-Kanäle bekannt, die hinsichtlich ihrer Sequenz und Funktion in sechs Subfamilien unterteilt werden: Schwache einwärts gleichrichtende TWIK-Kanäle (Tandem of Pore Domain in a Weak Inward Rectifying K⁺-channels), mechanosensitive TREK-Kanäle (TWIK-Related K⁺-channels), basisch-aktivierbare TALK-Kanäle (TWIK-Related Alkaline pH Activated K⁺-channels), säuresensitive TASK-Kanäle (TWIK-Related Acid-Sensitive K⁺-channels), durch Halothan inhibierbare THIK-Kanäle (Tandem Pore Domain Halothane-Inhibited K⁺-channels) und im Rückenmark exprimierte TRESK-Kanäle (TWIK-Related Spinal Cord K⁺-channels) (Honoré, 2007; Enyedi und Czirják, 2010; Lesage und Barhanin, 2011).

Der Schaltmechanismus von K_{2P}-Kanälen, also der Prozess, durch den sich die Kanäle zwischen offenen und geschlossenen Zuständen bewegen, ist noch nicht vollständig geklärt, aber durch Erkenntnisfortschritte konnten wichtige Hypothesen über ihre Eigenschaften formuliert werden.

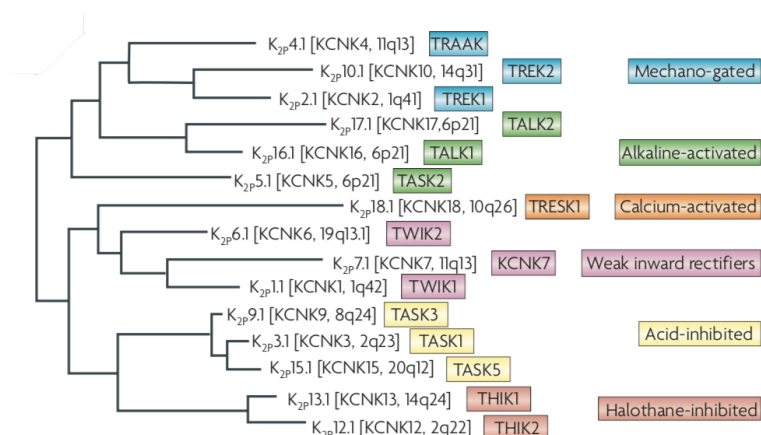


Abbildung 2: Dendrogramm der K_{2P}-Kanäle. Die K_{2P}-Kanäle werden in sechs Subfamilien unterteilt und in der Abbildung werden die Verwandtschaftsbeziehungen durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet. Dabei werden die Nomenklatur, die chromosomale Lokalisation und die funktionellen Eigenschaften der fünfzehn K_{2P}-Kanäle angegeben (Honoré, 2007).

1.2.1. Aufbau und Struktur von K₂P-Kanälen

Zu den aufregendsten Ergebnissen auf dem Gebiet der K₂P-Kanäle gehören die ersten Kristallstrukturen der K₂P-Kanäle TRAAK und TWIK-1 (Brohawn et al., 2012; Miller und Long, 2012). Denn wegen der ähnlichen Molekularstrukturen können diese Kristallstrukturen auch auf die Modellierung anderer K₂P-Kanäle angewendet werden. Die Hauptmerkmale einer TRAAK-Struktur werden in Abbildung 4 dargestellt. Jede Untereinheit besteht aus vier Transmembrandomänen, zwei Porendomänen und jeweils einem auf der zytoplasmatischen Seite liegenden Carboxyl- bzw. C-Terminus und einem Amino- bzw. N-Terminus (Brohawn et al., 2012). Im Unterschied zu anderen Kaliumkanälen, die Tetramere bilden, assemblieren K₂P-Kanäle zu Dimeren, aus denen sich jeweils eine pseudotetramere kaliumselektive Kanalpore bildet. Der Selektivitätsfilter (SF) wird dabei durch eine hochkonservierte Aminosäuresequenz [T-(X)-G-(X)-G] repräsentiert und ist für die hohe Permeabilität und Selektivität von Kaliumkanälen verantwortlich.

Zwischen den Domänen TM1 und P1 befindet sich eine Coiled-Coiled-Cap Struktur, die mit der gleichen Struktur der zweiten Untereinheit des Dimers über eine Disulfidbrücke eine kovalente Bindung eingeht (Lesage et al., 1996).

Ein weiteres Merkmal ist das Vorhandensein einer lateralen Fenestrierung zwischen TM2 und TM4 bei allen bekannten K₂P-Kanälen, wodurch eine Verbindung zwischen der Kavität und der Lipidmembran hergestellt werden kann. Die Kavität ist dabei ein wassergefüllter Raum unterhalb des SF (Brohawn et al., 2012).

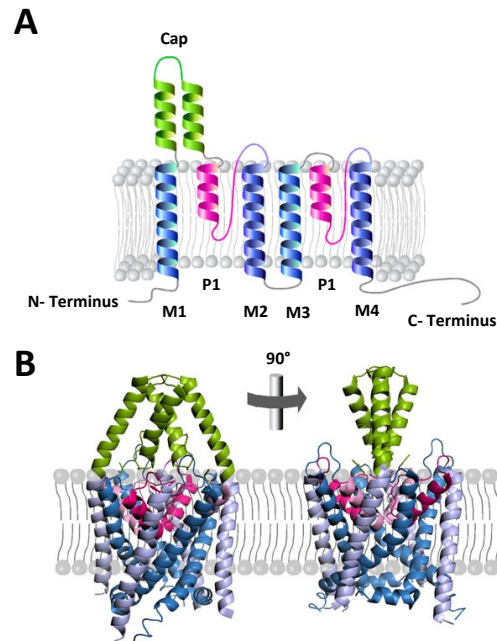


Abbildung 3: Struktureller Aufbau der K_{2P} -Kanäle. **A)** Schematische Darstellung der K_{2P} -Kanal-Untereinheiten mit den beiden Porendomänen (pink), den vier Transmembrandomänen (blau), der extrazellulären Coiled-Coiled-Cap Struktur (grün) und auf dem jeweils auf der zytoplasmatischen Seite liegenden Carboxyl- bzw. C-Terminus- und dem Amino- bzw. N-Terminus. **B)** Kristallographische Rekonstruktion der K_{2P} -Kanal-Merkmale am Beispiel des TWIK-1-Kanals (Miller und Long, 2012; PDB-ID: 3UKM). Die verschiedenen Domänen werden mit denselben Farben wie in A) dargestellt (Feliciangeli et al., 2015).

1.2.2. Die Rolle des SF beim Schaltverhalten

Aus den kristallographischen Daten ergeben sich für die K^+ -Kanäle unterschiedliche Mechanismen für das Gating- bzw. Kanalschaltverhalten. In den K_v - und K_{ir} -Kanälen erfolgt die Modulation der Aktivität über das Öffnen und Schließen von zwei verschiedenen Schaltmechanismen. Bei den K_v - und K_{ir} -Kanälen gibt es sowohl ein unteres Schaltverhalten, das sogenannte Helix-Bundle-Crossing, als auch ein oberes Schaltverhalten, das sich auf die äußere Pore und den SF bezieht (Schulte et al., 2001; Yellen, 2002; Rapedius et al., 2007).

In den meisten K^+ -Kanälen ermöglicht die Öffnung des Helix-Bundle-Crossing den Fluss von Kaliumionen durch die Membran (Loussouarn et al., 2002; Yellen, 2002; Swartz, 2004). Bei den K_{2P} -Kanälen konnte dagegen nachgewiesen werden, dass das Helix-Bundle-Crossing auch im geschlossenen Zustand des Kanals offen bleibt, wodurch ein zustandsunabhängiger Zugang von der intrazellulären Seite zur Kanalkavität ermöglicht wird (Piechotta et al., 2011; Miller und Long, 2012). Deshalb kann man annehmen, dass

sich die primären Aktivierungsmechanismen innerhalb des SF befinden (Bagriantsev et al., 2011; Brohawn et al., 2012).

Im folgenden Abschnitt wird der Ionenfluss durch die Pore eines K_{2P} -Kanals beschrieben: Wenn die K_{2P} -Kanäle geöffnet werden, dann können Kaliumionen passiv vom Intrazellulärraum durch das Helix-Bundle-Crossing in die Kanalkavität gelangen. Dort werden die Kaliumionen durch acht Wassermoleküle hydratisiert. Die Kaliumselektivität wird erst am engsten Teil des Ionenpermeationsweges wirksam, der als SF bekannt ist. Er befindet sich im äußeren Drittel der Membran zwischen der Kavität und der extrazellulären Lösung und verfügt über vier Kaliumbindungsstellen (Abb. 5 A). Wegen der Enge des SF können die K^+ -Ionen nur nach einem Verlust der Hydrathülle eintreten. An dieser Stelle übernehmen die Carbonyl-Sauerstoffatome der Peptidbindungen und zwar vier oberhalb und vier unterhalb jedes Kaliumions die Rolle des Sauerstoffs in den Wassermolekülen der Hydrathülle (Abb. 5 B). Danach gelangt das Kaliumion in den Extrazellulärraum (Choe, 2002; MacKinnon, 2004). Mit Natriumionen ist dies nicht möglich, da sie zum Dehydrieren mehr Energie benötigen und einen kleineren Ionenradius haben, wodurch keine optimale Koordinierung mit den Carbonyl-Sauerstoffatomen erreicht werden kann (MacKinnon, 2004).

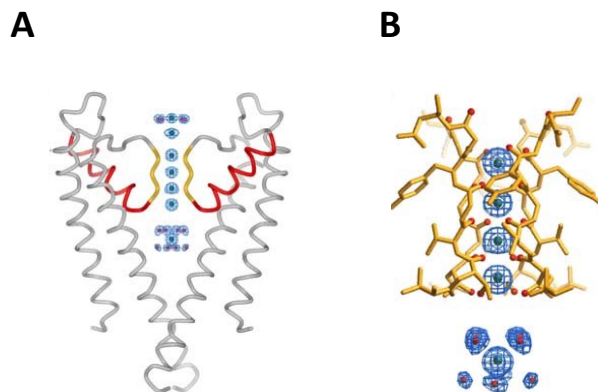


Abbildung 4: Kristallographische Darstellung des SF und der Ionenleitung bei Kaliumkanälen am Beispiel von KcsA. A) Zwei der vier Untereinheiten der KcsA-Pore werden mit der extrazellulären Seite nach oben dargestellt. Jede Untereinheit verfügt über eine äußere Helix nahe der Membran, eine innere Helix nahe der Pore, eine Porenhelix (rot) und einen SF (gelb). Das blaue Gitter zeigt die Elektronendichte für K^+ -Ionen und Wasser entlang der Pore. **B)** Nahansicht des SF mit dehydrierten K^+ -Ionen an den Positionen 1 bis 4 (von extrazellulär nach intrazellulär) im Filter und einem hydratisierten K^+ -Ion in der Kavität unterhalb des SF (MacKinnon, 2004).

1.3. Der TRESK K_{2P}-Kanal und seine Regulation

1.3.1. Expressionsmuster

Ursprünglich wurde TRESK-mRNA im Rückenmark vor allem in den Hinterwurzelganglien von mehr als 90 % der Neuronen gefunden (Kang et al., 2006; Tulleuda et al., 2011). Durch *in-situ*-Hybridisierung und Einzelkanalmessungen konnte diese Lokalisierung bestätigt werden (Dobler et al., 2007).

Darüber hinaus konnte TRESK-mRNA auch in anderen sensorischen Ganglien nachgewiesen werden, wie dem Trigeminalganglion, dem Cerebrum, dem Cerebellum, in autonomen Nervensystem-Ganglien und in den Hoden (Dobler et al., 2007).

1.3.2. Die pathophysiologische Rolle von TRESK K_{2P}-Kanälen

Migräne hat eine sehr hohe Prävalenz und betrifft etwa 10-15 % der erwachsenen Bevölkerung. Dabei wurde darüber berichtet, dass eine dominant-negative Mutation im TRESK K_{2P}-Kanal mit einer Migräne zusammenhängt (Lafrenière et al., 2010), wobei das KCNK18-Gen bei 16 Mitgliedern einer großen multigenerationalen Familie nachgewiesen werden konnte. Davon waren acht Mitglieder mit einem mutierten KCNK18-Gen mit der F139WfsX24-Mutation alle von typischen Migräne-Kopfschmerzen betroffen. Bei den acht unbeeinflussten Individuen kam im Unterschied dazu die TRESK-Mutation nicht vor. In einer aktuellen Studie desselben Autors wurde eine zweite Frameshift-Mutation von KCNK18 bei einem anderen ungebundenen Migränepatienten gefunden. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass die dominant-negative TRESK-Mutation tatsächlich unmittelbar mit der Migräne-Pathogenese zusammenhängt. Dabei können die KCNK18-Mutationen allerdings nur für eine geringe Anzahl von Migränefällen verantwortlich gemacht werden. Dennoch machen die Untersuchungen dieser Art von Kopfschmerzen deutlich, dass bestimmte Zusammenhänge zwischen TRESK K_{2P}-Kanal und der Migräne-Pathogenese bestehen (Enyedi et al., 2012).

Schmerz ist darüber hinaus mit einer Vielzahl von Verletzungen und Krankheiten verbunden. Weltweit leiden mehr als 1,5 Milliarden Menschen an akuten oder chronischen Schmerzen. Bei der Schmerzwahrnehmung spielen viele Ionenkanäle eine wichtige Rolle und dabei auch die K_{2P}-Kanäle (Kang et al., 2008). Dem TRESK K_{2P}-Kanal

kommt eine besondere Bedeutung zu, weil er, wie bereits erwähnt wurde, mit einer hohen Expressionsrate in Hinterwurzelganglien und anderen sensorischen Ganglien vorkommt. Der TRESK K_{2P} -Kanal wird durch den Entzündungsmediator Lysophosphatidsäure aktiviert, was dann zu einer Schwellenwertanhebung für Schmerzreize führt, wodurch die nozizeptive Signalgebung in DRG-Neuronen reduziert wird (Noël et al., 2009; Pereira et al., 2014; Kollert et al., 2015). Deshalb könnten spezifische Aktivatoren des TRESK K_{2P} -Kanal eine nützliche Strategie für die Entwicklung neuer Analgetika zur Behandlung vieler Schmerzarten sein.

1.3.3. Strukturelle Besonderheiten des TRESK K_{2P} -Kanals

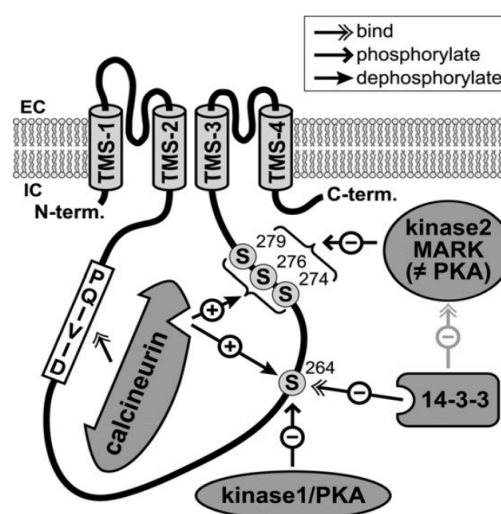
TRESK K_{2P} -Kanal bildet selbst eine Unterfamilie der K_{2P} -Kanäle. Wie auch andere K_{2P} -Kanäle ist er durch eine geringe Aminosäuresequenzidentität von 19 % bestimmt (Sano et al., 2003), sodass es für ihn im Unterschied zu den Mitgliedern der anderen fünf K_{2P} -Unterfamilien keinen engen Verwandten gibt (Keshavaprasad et al., 2005; Czirják und Enyedi, 2006).

Ein charakteristisches Strukturmerkmal von TRESK K_{2P} -Kanal ist die lange zytoplasmatische Domäne zwischen dem zweiten und dem dritten Transmembransegment, während der homologe Teil aller anderen K_{2P} -Kanäle relativ kurz ist. Diese Domäne enthält beim TRESK K_{2P} -Kanal wichtige regulatorische Regionen einschließlich der Bindungsstellen für Calcineurin und das Adapterprotein 14-3-3. Im Vergleich mit den anderen K_{2P} -Kanälen verfügt TRESK K_{2P} -Kanal über einen kurzen C-Terminus, weshalb man annehmen kann, dass es für ihn eine eigene Regelung gibt (Enyedi et al., 2012).

1.3.4. Regulation durch Ca^{2+} und Proteininteraktionen

Die Regulation vom TRESK K_{2P} -Kanal durch eine Gq-gekoppelte Rezeptor-Aktivierung unterscheidet sich qualitativ von der bei den anderen K_{2P} -Kanälen. Während die anderen Kanäle nicht durch Calcium-mobilisierende Agonisten beeinflusst werden, wird der TRESK K_{2P} -Kanal durch die Stimulation von M1-Muscarin- oder AT1a-Angiotensin-II-Rezeptoren 5-bis 15-fach aktiviert (Enyedi und Czirják, 2010).

Das Adapterprotein 14-3-3 bindet durch die Proteinkinase A nach der Phosphorylierung des zweiten Serins im RSNSCPE-Motiv am TRESK K_{2P} -Kanal. Dieses Protein hemmt dann die Rückkehr des TRESK K_{2P} -Kanalstroms in den Ruhezustand nach der durch Calcineurin vermittelten Aktivierung (Czirják et al., 2008). Darüber hinaus hemmt das Adapterprotein auch MARK-Kinasen, die wiederum für die Rephosphorylierung des S274, 276, 279 Clusters und für die Rückkehr des TRESK K_{2P} -Kanalstroms in den Ruhezustand nach der von Calcineurin abhängigen Aktivierung verantwortlich sind (Suzuki et al., 2004; Watkins et al., 2008; Matenia und Mandelkow, 2009).



10

1.3.5. Pharmakologische Regulation

TRESK K_{2P} -Kanal ähnelt in seinem pharmakologischen Profil anderen K_{2P} -Kanälen in vielerlei Hinsicht. So ist er etwa unempfindlich gegen mehrere klassische K^+ -Kanalblocker (4-Aminopyridin, Apamin, CsCl) und auch ATP-sensitive K^+ -Kanalblocker (Tolazamid, Glipizid) (Enyedi und Czirják, 2015).

Extrazelluläres Ba^{2+} hemmt den TRESK K_{2P} -Kanalstrom nur bei hoher Konzentration. Diese Hemmung ist spannungsabhängig und wird durch das Membranpotential reduziert, was darauf hindeutet, dass Ba^{2+} sich im elektrischen Feld an den Kanal bindet. Demgegenüber blockieren Chinin, Chinidin, Arachidonsäure und mehrfach ungesättigte Fettsäuren den TRESK K_{2P} -Kanal effizient. Außerdem konnten Sano et al. zeigen, dass der TRESK K_{2P} -Kanal durch Kaliumkanalblocker wie Propafenon (ATP-sensitiver K^+ -Kanalblocker), Lidocain (Na^+ -Kanalblocker) und Triethanolamin (nicht-selektiver K^+ -Kanalblocker) inhibiert werden kann (Sano et al., 2003).

Amide Lokalanästhetika beeinflussen mehrere K_{2P} -Kanäle und dabei auch TRESK K_{2P} -Kanal (Sano et al., 2003). Die Rangordnung der konzentrationsabhängigen Hemmung sieht für den TRESK K_{2P} -Kanal wie folgt aus: Bupivacain > Tetracain > Ropivacain > Chlorprocain > Mepivacain > Lidocain mit IC_{50} im Bereich von 80 μM und 3 mM (Liu et al., 2004). Unter den Lokalanästhetika-Verbindungen erwies sich Benzocain als besonders nützlich bei den Studien der TRESK K_{2P} -Kanalregulation des *Xenopus*-Oozyten. Denn dieses Medikament übt eine hemmende Wirkung auf den TRESK K_{2P} -Kanalstrom über Calcineurin aus, wobei die Regulation des TRESK K_{2P} -Kanals durch Benzocain vom Phosphorylierungszustand des Kanals abhängt (Czirják und Enyedi, 2006).

TRESK K_{2P} -Kanal wurde auch als ein Ziel der flüchtigen Anästhetika identifiziert, wobei der Strom durch Isofluran, Halothan und Desfluran aktiviert wurde. Die wirksame Konzentration jedes Medikaments liegt dabei innerhalb des klinisch verwendeten Konzentrationsbereichs (Enyedi und Czirják, 2015). Darüber hinaus führt die Kanalaktivierung in den sensorischen Neuronen und evtl. auch in anderen Teilen des zentralen Nervensystems zu einer Hyperpolarisation, die ebenfalls für die Allgemeinanästhesie genutzt werden kann (Liu et al., 2004).

Einige Antidepressiva und Antikonvulsiva bewirken eine Verbesserung neuropathischer Schmerzen, weshalb auch sie auf ihre Wirkung auf K_{2P} -Kanäle getestet wurden. Antidepressiva wie Amitriptylin, Fluoxetin und Citalopram hemmen den TRESK K_{2P} -

Kanal (Kang und Kim, 2004). Außerdem konnten Kang et al. zeigen, dass auch das Antikonvulsivum Lamotrigin den TRESK K_{2P} -Kanal inhibiert (Kang et al., 2008).

Bei den neuen Modulatoren hemmt das Antihistaminikum Loratadin ebenfalls die TRESK K_{2P} -Kanalaktivität mit einem submikromolaren IC_{50} -Wert (Enyedi und Czirják, 2015).

1.4. Motivation und Ziel der Arbeit

Der TRESK K_{2P} -Kanal weist die geringste Sequenzhomologie mit den anderen K_{2P} -Kanälen auf und ist das einzige Mitglied der Unterfamilie der durch Calcium aktivierten K_{2P} -Kanäle (Enyedi und Czirják, 2015). Die Regulation des TRESK K_{2P} -Kanals ist von großer Bedeutung, da er an wichtigen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist. Es sind bereits einige Substanzen bekannt, die den TRESK K_{2P} -Kanal inhibieren. Dabei sind vor allem quaternäre Ammoniumionen zu erwähnen, die als klassische Porenblocker bekannt sind (Piechotta et al., 2011). Auch andere Substanzen wie Loratadin und endogene Lipide wie AA wurden bereits als Inhibitoren des TRESK K_{2P} -Kanals beschrieben (Sano et al., 2003; Enyedi und Czirják, 2015). Es wurde allerdings noch nicht eingehend untersucht, wie diese Inhibitoren auf das Schaltverhalten des TRESK K_{2P} -Kanals wirken.

In der vorliegenden Arbeit soll mit elektrophysiologischen und molekularbiologischen Techniken das Inhibitionsverhalten von verschiedenen Pharmaka und von endogenen Lipiden auf den TRESK K_{2P} -Kanal untersucht werden. Dabei werden die Bindungsstellen, die Mechanismen der Inhibition und die strukturellen Grundlagen betrachtet

2. Material und Methoden

2.1. cRNA-Synthese und Mutagenese

In der vorliegenden Arbeit wurde für die elektrophysiologischen Experimenten der Ausgangsklon des TRESK K_{2P}-Kanals verwendet. Dabei wurde zunächst eine kompetente *E. coli* k12 DH5 α für die Vermehrung transformiert und auf Ampicillin-LB-Agar-Platten (LB-Medium Luria/Mille, Roth, Karlsruhe, Deutschland) über Nacht angezüchtet. Die einzelnen Klone wurden dann von den Ampicillin-LB-Agar-Platten isoliert, mit einer Flüssigkeitskultur angeimpft und erneut über Nacht in einem Schüttler inkubiert. Für die Plasmidisolierung aus den Bakterien wurde das Maxiprep-Kit „GeneJET Plasmid Maxiprep Kit #K0491“ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) verwendet. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt.

Für die Herstellung von TRESK-cRNA wurde die Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym MluI (ER0562, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) linearisiert und dann mit der Hilfe eines Kits (Nucleo Spin Gel und PCR-Clean-Up REF74060950, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gereinigt. Für die *in-vitro*-Transkription der RNA wurde das „Ambion mMessage mMachine SP6 Transcription“-Kit (CAT#AM1340, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Dabei wurde die für die Proteinexpression benötigte cRNA mit einer RNA-Polymerase aus einem linearisierten DNA-Template hergestellt. Durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (Roti Phenol/Chloroform A156.3, Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden die Proteine, DNA und cRNA herausgelöst, um dann durch einen Zusatz von Ethanol die cRNA zum Ausfallen zubringen. Das zuvor gewaschene und getrocknete Pellet wurde dann in 20 μ l RNase-freiem Wasser resuspendiert. Danach wurde die Qualität der cRNA mit einer Agaroseelektrophorese bestimmt (0,8 % Agarose in Tris-Acetate-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer) und die Konzentration der cRNA wurde mit einem Spektralphotometer (NanoDrop Products, Wilmington, USA) gemessen. Bis zur Injektion in die Oozyten wurde die synthetisierte cRNA bei -20 °C gelagert.

Die Mutanten wurden durch die Anwendung des „Site-Directed Mutagenesis Kit“ (E05525, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) nach den Herstellerangaben hergestellt, wobei eine Punktmutation der Ausgangsklone mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt wurde.

2.2. Oozyten als Expressionssystem

2.2.1. Oozytenpräparation

Die elektrophysiologischen Messungen wurden an den Oozyten der adulten Froschweibchen *Xenopus laevis* durchgeführt. Dafür wurden die Frösche zunächst für die Gewinnung der Oozyten für 10 Minuten in einem mit dem Lokalanästhetikum Tricain (Ethyl-3-aminobenzoat-methansulphonat) und Wasser gefüllten Behälter betäubt. Das Ovargewebe wurde dann bei einem auf Eis gelagerten Frosch durch einen abdominalen Schnitt entnommen und wiederholt in OR1-Lösung gespült. Bei einer einstündigen Inkubation in OR1-Lösung mit Kollagenase Typ 2 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) wurden die restlichen Kollagene im Follikelgewebe enzymatisch verdaut. Die Kollagenase-Aktivität wurde dann durch Spülen der Oozyten in einer Ca^{2+} -haltigen OR2-Lösung unterbrochen. Anschließend wurden die Oozyten des Reifestadiums V-VI nach Dumont (Dumont, 1972) unter einem Stereomikroskops aussortiert und manuell vereinzelt. Diese Oozyten wurden bis zur Injektion in OR2-Lösung bei 17 °C im Brutschrank gelagert. Jeder Frosch wurde maximal viermal in einem Abstand von 12 Wochen operiert.

Alle verwendeten Lösungen werden in Kapitel 2.5 detailliert beschrieben.

2.2.2. cRNA-Injektion und die Expression in Oozyten

Zwei bis sechs Stunden nach der Präparation wurde den Oozyten die cRNA unter einem Stereomikroskop injiziert. Dafür wurde zunächst unter einem Mikroskop die Follikelschicht der Oozyten mit zwei Pinzetten entfernt. Dabei wurden die aus Borosilikatglas hergestellten Injektionspipetten (GB150T-10, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) mit einem Mikropipettenpuller (Model P-97 und Model P-1000, Sutter Instruments Co., USA) aufgezogen und an einem Draht scharf bis zu einem Durchmesser von 15-20 µm abgebrochen. Anschließend wurden mit einer manuellen Injektionsspritze unter einem Stereomikroskop ca. 50 nl der jeweiligen cRNA, die vorher vom einem sterilen Paraffinfilm aufgezogen wurde, am dunklen Pol der Oozyten injiziert. Die Oozyten wurden dann in mit steriler Testlösung befüllten TC-Platten (24 Well, Standard F, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) im Brutschrank bei 17 °C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Nach 2 bis 4 Tagen erfolgte die Expression der

jeweiligen Kanalproteine in der Plasmamembran, sodass mit den elektrophysiologischen Experimenten an den Oozyten begonnen werden konnte.

Alle verwendeten Lösungen werden in Kapitel 2.5 detailliert beschrieben.

2.3. Elektrophysiologische Messungen

2.3.1. Die Patch-clamp Methode

In der vorliegenden Arbeit wurde für die elektrophysiologischen Experimente die Patch-clamp Methode angewendet. Diese Methode wurde von Erwin Neher und Bert Sakmann 1976 entwickelt und von Hamill et al. an die elektrophysiologische und biophysikalische Untersuchung von Ionenkanälen in der Membran einer Zelle angepasst (Neher und Sakmann, 1976; Hamill et al., 1981).

Bei der Patch-clamp Technik kann man vier verschiedene Methoden unterscheiden. Dabei beginnt man bei allen Methoden mit dem Anpressen der Patchpipette an die Zellmembran. Danach erzeugt man durch einen Unterdruck ein Gigaseal, also einen Abdichtungswiderstand zwischen der Pipette und dem Membranpatch im Gigaohm-Bereich. Diesen Modus bezeichnet man als „on-cell“- oder „cell-attached“-Konfiguration und er ermöglicht Messungen an intakten Zellen und bildet die Grundvoraussetzungen für die anderen Konfigurationen. Ausgehend von der „on-cell“-Konfiguration kann durch eine starke Unterdruck-Applikation die Zellmembran durchbrochen werden, wobei die Abdichtung zwischen der Glaspipette und der Zellmembran nicht beeinflusst wird. Diese Konfiguration wird als „whole-cell“-Modus bezeichnet. Um in die „outside-out“-Konfiguration zu wechseln, wird die Glaspipette unter kontinuierlichem Unterdruck herausgezogen. Dabei gelangen die beiden Enden des Patches in die Mitte und fusionieren miteinander, wodurch die Membranaußenseite der Badlösung ausgesetzt wird. Durch einen Zug an der Glaspipette aus der „on-cell“-Konfiguration ergibt sich die „inside-out“-Konfiguration, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Bei der „inside-out“-Konfiguration ist die intrazelluläre Seite der Zellmembran der applizierten Badlösung zugewandt.

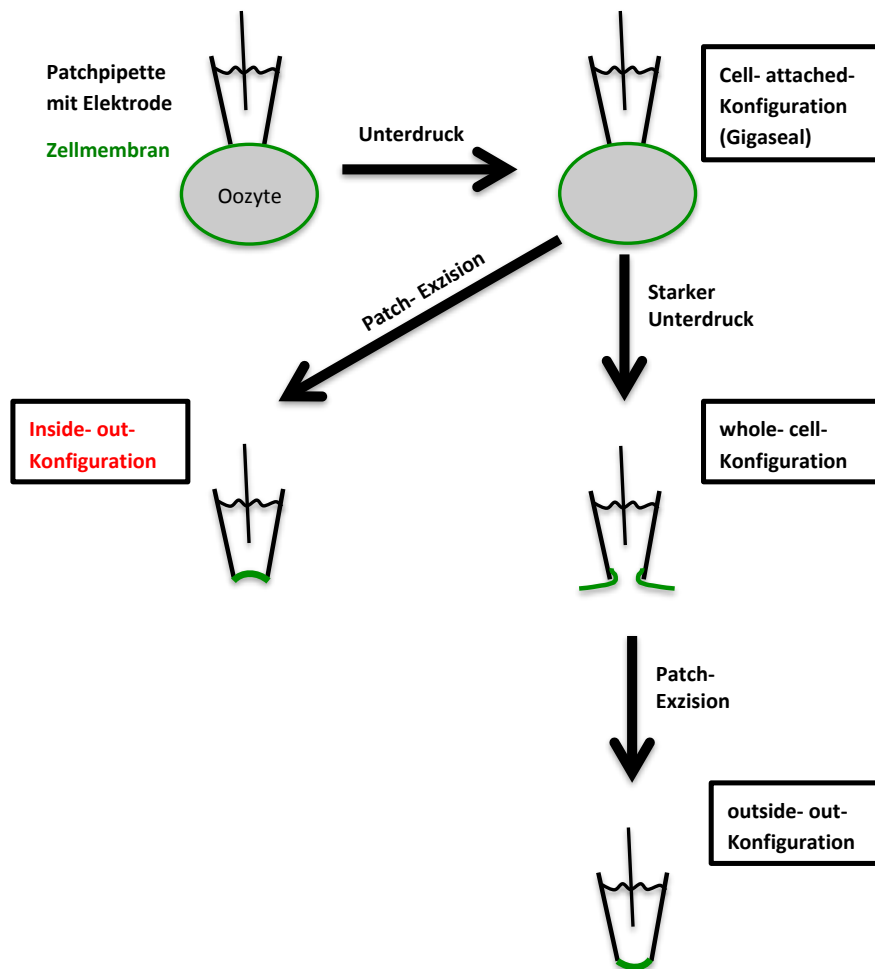


Abbildung 6: Darstellung der vier unterschiedlichen Patch-clamp Konfigurationen. Die „on-cell“-Konfiguration bildet den Ausgangszustand für die anderen Patch-clamp Konfigurationen. Durch einen Zug an der Glaspipette kann man in die „inside-out“-Konfiguration wechseln und durch die Applikation eines stärkeren Unterdruckes ist ein Übergang in die „whole-cell“-Konfiguration möglich. Von der „whole-cell“-Konfiguration gelangt man durch das Herausziehen der Pipette zur „outside-out“-Konfiguration.

2.3.2. Durchführung der elektrophysiologischen Messungen

Zu Beginn der Patch-clamp Messungen wurden die Patchpipetten mit einem Mikropipettenpuller (Model P-97 und Model P-1000, Sutter Instruments, USA) aus Borosilikatglaspipetten (GB200-8P, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) hergestellt. Sie wurden dann mit einem erhitzten Platindraht auf einen Durchmesser von 40-60 μm poliert, was einem Pipettenwiderstand von 400- 600 $\text{k}\Omega$ entspricht.

Danach wurde die mit cRNA versetzte und in der Inkubationslösung aufbewahrte Xenopus-Oozyte devitalisiert und dann in eine mit Badlösung gefüllte Messkammer gelegt, deren Boden aus einem Deckglas bestand. Unterhalb der Messkammer befand sich

ein inverses Lichtmikroskop (Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Das Multibarrelsystem, das aus 12 Glasröhrchen bestand, diente als Applikationssystem und ragte in die Messkammer hinein. Über dieses System war es möglich, pro Patch mehrere unterschiedliche Substanzen oder unterschiedliche Konzentrationen einer Substanz zu applizieren. Über das Absaugsystem an der Messkammer konnten die verschiedenen Lösungen kontinuierlich abfließen.

Die Patchpipette wurde mit einem dünnen Mikrofilament (MicroFil, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, USA) blasenfrei befüllt und über einen chlorierten Silberdraht in den Pipettenhalter eingespannt. Danach wurde der Pipettenhalter unter Überdruck in die Messkammer eingetaucht, wobei durch den Überdruck sowohl eine Vermischung der Bad- und der Pipettenlösung als auch eine Kontamination der Patchpipette verhindert werden konnten. Um eine Abdichtung des Übergangs zwischen der Pipettenspitze und der Zellmembran und dadurch die Entstehung eines stabilen Gigaseals zu erreichen, wurde beim Annähern der Patchpipette an die Oozyte durch vorsichtiges Saugen zwischen Überdruck und Unterdruck gewechselt. Dabei wurde ein Teil der Oozytenmembran an die Patchpipette gezogen, wodurch eine cell-attached-Konfiguration eingestellt werden konnte. Für eine Exzision des Membranpatches wurde der Pipettenmikromanipulator ruckartig zurückgefahren. Im Anschluss daran konnten die Messungen in der inside-out-Konfiguration durchgeführt werden. Dafür wurden die Substanzen, die als intrazelluläre Lösungen wirkten, über das Multibarrelsystem auf die zytoplasmatische Seite des exzidierten Patches appliziert, wobei sowohl das Multibarrelsystem als auch der Pipettenhalter mit dem Mikromanipulator (SM1, Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) verbunden waren und unabhängig voneinander bewegt werden konnten.

2.4. Datenaufnahme und Statistik

Die elektrophysiologischen Messdaten wurden mit einem Computer mit dem Betriebssystem Mac OS X (Apple iMac, CA, USA) generiert. Für die Datenaufnahme wurde der mit dem Computer verknüpfte und digital gesteuerte Verstärker (HEKA EPC 10 USB Single) mit der Software PatchMaster v2x72 (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Rheinland-Pfalz, Deutschland) verwendet. Die Messdaten wurden dann in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft-Office Excel, Redmond, WA, USA) übertragen und ausgewertet, wobei der arithmetische Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler (SE) berechnet wurden.

Dafür wurden die folgenden Formeln verwendet:

Mittelwert (MW): $MW = \frac{\sum x_i}{n}$

MW = Mittelwert

x_i = Messwert

n = Anzahl der Messwerte

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

MW = Mittelwert

x_i = Messwert

n = Anzahl der Experimente

Standardfehler (SE): $SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$

SD = Standardabweichung

n = Anzahl der Experimente

Für die weitere Darstellung und Auswertung der Messdaten wurde das Datenanalyseprogramm „IGOR Pro v6.34A“ (WaveMetrics, Inc., Lake Oswego, USA) verwendet. Die mittlere Inhibitionskonzentration (IC_{50}) wurde mit der Hill-Funktion bestimmt. Dabei wurden zunächst die gemessenen Ströme auf den maximalen Stromwert der jeweiligen Einzelmessung normiert, um dann die Mittelwerte aus den entsprechenden Messreihen zu bestimmen.

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

I = Stromstärke bei der Applikation von X

I_{max} = Maximalamplitude der Stromstärke

X = Konzentration der applizierten Substanz

X_{1/2} = Konzentration der applizierten Substanz für einen halbmaximalen Effekt

H = Hill-Koeffizient

Die prozentuale Inhibition des Kaliumstroms durch einen Kaliumkanalinhibitor wurde wie folgt berechnet:

$$Inhibition [\%] = 1 - \frac{I_{inhibiert}}{I_{basal}} \times 100$$

I_{inhibiert} = Stromstärke nach der Applikation des Inhibitors

I_{basal} = Stromstärke bei den Ausgangsbedingungen

2.5. Verwendete Chemikalien und Lösungen

2.5.1. Verwendete Chemikalien

Die verwendeten Substanzen wurden als Stammlösungen angelegt und bei -20 °C aufbewahrt, bis sie unmittelbar vor dem Beginn der Experimente anhand mit der Badlösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt wurden.

SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland:

Tetraethylammoniumchlorid (TEA-Cl); CAS: 56-34-8; gelöst in Wasser

Tetrapropylammoniumchlorid (TProA-Cl); CAS: 5810-42-4; gelöst in Wasser

Tetrabutylammoniumchlorid (TButA-Cl); CAS: 1112-67-0; gelöst in Wasser

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

Chlorpromazin: 2-Chloro-10-(3-dimethylaminopropyl)phenothiazine hydrochloride (CPZ); CAS: 69-09-0; gelöst in Wasser

BL-1249: (5,6,7,8-Tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl]-amin:

CAS: 18200-13-0; gelöst in DMSO

Arachidonsäure: *cis,cis,cis,cis*-5,8,11,14-Eicosatetraensäure (AA);

CAS 6610-25-9; gelöst in Methanol

Anandamid: *cis,cis,cis,cis*-5,8,11,14-*n*-(2- hydroxyethyl) Icosatetraenamid (AEA);

CAS: 1094209-17-2; gelöst in Methanol

1,2-Dioctanoyl-*sn*-glycerol (DIC-8); CAS:24529-88-2); gelöst in Methanol

Biochrom AG, Berlin, Deutschland:

Benzylpenicillin-Natrium; CAS: 69-57-8

Streptomycinsulfat; CAS: 3810-74-0

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

2.5.2. Verwendete Lösungen

Oozyten-Inkubationslösungen

OR1-Lösung zur Lagerung der *Xenopus laevis* Oozyten bis zum Ende des Kollagenase-Verdaus:

pH 7,4; eingestellt mit NaOH-Lösung	
NaCl	82,5 mM
KCl	2 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM
HEPES	5 mM

OR2-Lösung zur Beendigung des Kollagenase-Verdaus der Oozyten:

pH 7,4; eingestellt mit NaOH-Lösung	
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,8 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM
HEPES	5 mM

Testlösung für die Lagerung der injizierten Oozyten:

pH 7,4; eingestellt mit NaOH-Lösung	
NaCl	54 mM
KCl	30 mM
NaHCO ₃	2,4 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,82 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,41 mM
Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	0,33 mM
TRIS	7,5 mM

Lösungen für die elektrophysiologischen Experimente

Badlösung: Standardisierte intrazelluläre Lösung, in der die zu untersuchenden Chemikalien auf die Zielkonzentrationen verdünnt wurden:

pH 7,4; eingestellt mit KOH- bzw. HCl-Lösung	
KCl	120 mM
HEPES	10 mM
EGTA	2 mM
Pyrophosphat	1 mM

Die Badlösung hatte einen pH-Wert von 7,4, wobei der physiologische pH-Wert durch eine Titration mit Salzsäure bzw. Kaliumhydroxid-Lösung eingestellt wurde. Der pH-Wert wird als negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration definiert. Um den pH-Wert der Badlösung konstant zu halten, wurde HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonsäure) als Puffersystem verwendet.

Für eine Imitierung des physiologischen Zustandes wurden weiterhin Kalium- und Chloridionen benötigt, die bei der Dissoziation von Kaliumchlorid entstanden.

Da in der Oozytenmembran endogen durch Calciumionen gesteuerte Chloridkanäle exprimiert sind, wurden die Ca²⁺-Ionen durch die Zugabe von EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) zur Badlösung komplexiert. Dadurch konnten die endogenen Chloridkanalströme im Wesentlichen unterdrückt werden.

Pipettenlösung: Standardisierte extrazelluläre Lösung:

pH 7,4; eingestellt mit KOH- bzw. HCl-Lösung	
KCl	120 mM
HEPES	10 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	3,6 mM

Zur Anregung der Bildung eines Gigaseals zwischen Membran und Patchpipette wurden 3,6 mM Ca²⁺ in der Pipettenlösung verwendet.

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Experimente werden in drei Abschnitte aufgeteilt:

- Die Inhibition der TRESK K_{2P} -Kanäle durch bekannte und neue Modellsubstanzen
- Die Inhibition der TRESK K_{2P} -Kanäle durch endogene Lipide
- Die strukturellen Besonderheiten der Inhibitionsmechanismen bei den TRESK K_{2P} -Kanälen

3.1. Inhibition der TRESK K_{2P} -Kanäle durch bekannte und neue Modellsubstanzen

3.1.1. Inhibition durch quaternäre Ammoniumverbindungen (QA)

Quaternäre Ammoniumionen (QA-Ionen) entstehen bei der Dissoziation von organischen Ammoniumverbindungen und verfügen zentral über ein positiv geladenes Stickstoff-Atom, das mit vier Alkyl-Resten verbunden ist (Abb. 7).

Die meisten K^+ -Kanäle werden durch intrazellulär appliziertes Tetraethylammonium (TEA) inhibiert (Armstrong, 1966), weshalb QA-Ionen als wertvolle Hilfsmittel für die Untersuchung der inneren Porenstruktur und des Schaltverhaltens von K^+ -Kanälen verwendet werden (Armstrong, 1966; Baukrowitz und Yellen, 1996; Yellen, 2002). Da die K_{2P} -Kanäle durch extrazelluläres TEA nicht inhibiert werden, wurden sie als insensitive gegenüber TEA beschrieben. Die Wirkung von intrazellulär applizierten QA-Ionen wurde auf K_{2P} -Kanäle weitgehend ignoriert (Lotshaw, 2007). 2011 konnten Piechotta et al. erstmals nachweisen, dass QA-Ionen intrazellulär K_{2P} -Kanäle reversibel und potent blockieren können. Die Bindungsstelle für die QA-Ionen in den K_{2P} -Kanälen konnte ebenfalls identifiziert werden und liegt in der Kavität der Pore unterhalb des SF (Piechotta et al., 2011).

Zur Charakterisierung der Wirkung von QA-Ionen auf TRESK K_{2P} -Kanäle wurden in der vorliegenden Arbeit Tetraethylammonium (TEA), Tetrapropylammonium (TProA) und Tetrabutylammonium (TButA) untersucht.

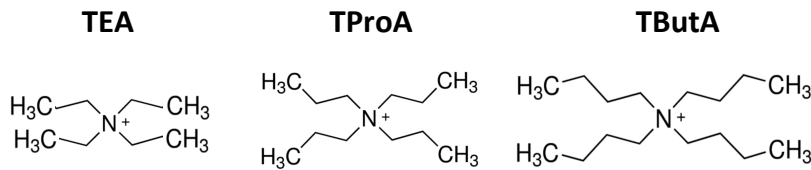


Abbildung 7: Strukturformeln der verwendeten QA-Ionen. Tetraethylammonium (TEA), Tetrapropylammonium (TProA) und Tetrabutylammonium (TButA).

In Abbildung 8 A wird eine elektrophysiologische Messung mit dem QA-Ion TEA dargestellt, wobei die Messungen mit der Standard-Badlösung und bei einer Klemmspannung von +40 mV durchgeführt wurden. Zu Beginn jeder Messung wurde zur Kontrolle der Patchqualität und zur Unterscheidung von Leck- und TRESK K_{2P} -Kanalströmen ein vollständiger Block des TRESK K_{2P} -Kanalstroms mit 100 μ M Tetrapentylammonium (TPenA) durchgeführt. Wie bereits von Piechotta gezeigt wurde, verläuft die Inhibition der TRESK K_{2P} -Kanäle durch TPenA schnell, vollständig und reversibel (Piechotta et al., 2011). Danach wurde der exzidierte Patch wieder in die Badlösung eingeführt, um dann mit der Applikation einer niedrigen Konzentration von 100 μ M TEA zu beginnen. Dadurch kam es nur zu einer geringen Inhibition der Kanäle. Nach Erreichen der konzentrationsabhängigen Stromantwort wurde der Patch zur nächsthöheren Konzentration geführt. Der Strom wurde bei einer Konzentration von 100 000 μ M nahezu vollständig blockiert (Abb. 8 A). Bei allen Messungen wurden die Substanzen auf der intrazellulären Seite des Patches appliziert.

Zur Bestimmung der mittleren Inhibitionskonstante (IC_{50}) mit der Hill-Funktion wurden die Substanzen in steigender Konzentration appliziert, die Ströme wurden gemessen und die Werte wurden normiert und gemittelt. Die Abbildungen 8 B-D zeigen die Dosis-Wirkungskurven für TEA, TProA und TButA. Der IC_{50} -Wert für die QA-Inhibition nimmt von TEA ($5550,31 \pm 370,42 \mu$ M) zu TProA ($163,30 \pm 13,21 \mu$ M) und TButA ($3,30 \pm 0,37 \mu$ M) ab (Abb. 8 B-D). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die zunehmende Alkylkettenlänge in den QA-Ionen zur Erhöhung der Affinität für den TRESK K_{2P} -Kanal führt.

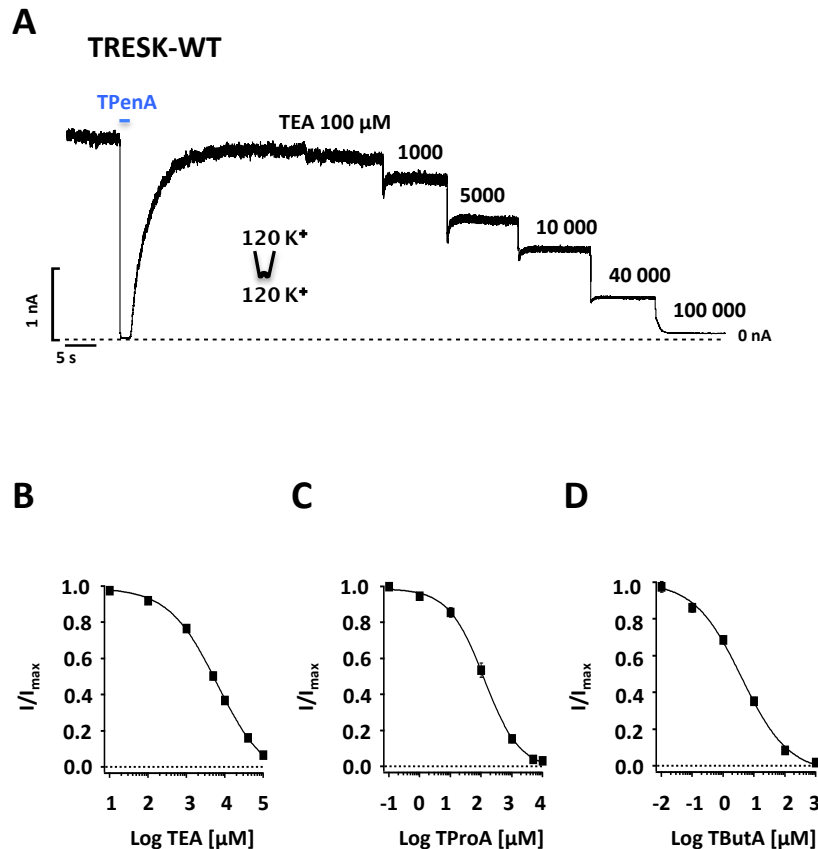


Abbildung 8: Einfluss von QA-Ionen auf den TRESK K_{2P}-Kanal. **A)** Repräsentativer Stromverlauf des TRESK K_{2P}-Kanals und konzentrationsabhängige Inhibition durch TEA in symmetrischen Kaliumionen-Konzentrationen bei +40 mV. Zur Kontrolle wurde der Ausgangsstrom mit TPenA (100 μ M) vollständig blockiert. **B-D)** Dosis-Wirkungskurven analysiert nach den Messungen wie in A) für TEA, TProA und TButA. Die IC₅₀-Werte für TEA (IC₅₀ = 5550,31 \pm 370,42 μ M; n = 5), TProA (IC₅₀ = 163,30 \pm 13,21 μ M; n = 6) und TButA (IC₅₀ = 3,30 \pm 0,37 μ M; n = 5) wurden mit der Hill-Funktion bestimmt.

3.1.2. Inhibition durch Chlorpromazin

Chlorpromazin (CPZ) ist ein wichtiges Antipsychotikum, das zur Behandlung von Schizophrenie und psychotischer Depression eingesetzt wird und bereits als ein Inhibitor des TREK-1 K_{2P}-Kanals beschrieben wurde (Patel et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung von CPZ auf den TRESK K_{2P}-Kanal erstmals untersucht, wobei eine konzentrationsabhängige Inhibition des Kanals gemessen werden konnte. Dabei wurde der Strom nach der Applikation von 100 μ M CPZ vollständig inhibiert. Die Dosis-Wirkungskurve wird in der Abbildung 9 B dargestellt. Bei einer Konzentration von 2,31 \pm 0,22 μ M wurden die TRESK K_{2P}-Kanäle durch CPZ halbmaximal blockiert (Abb. 9 B).

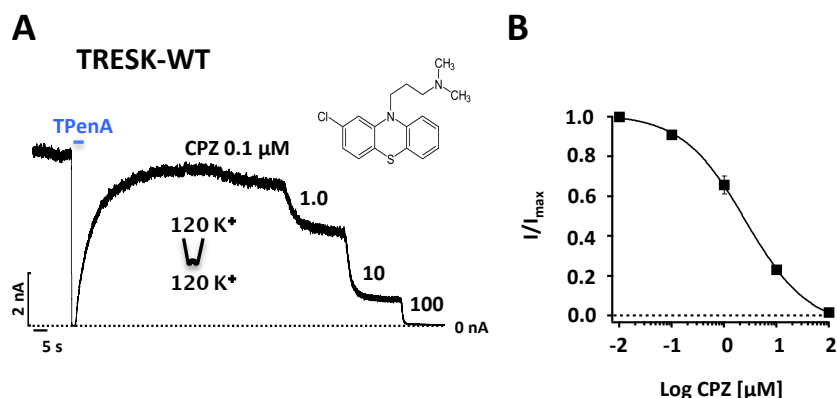


Abbildung 9: Einfluss von CPZ auf den TRESK K_{2P}-Kanal. **A)** Applikation von CPZ auf einen inside-out Patch mit TRESK K_{2P}-Kanälen bei einer Haltespannung +40 mV und symmetrischen K⁺-Konzentrationen. Oben rechts wird die Strukturformel von CPZ dargestellt. **B)** Aus den Messungen wie in A) wurde die Dosis-Wirkungskurve erstellt. Der IC₅₀-Wert für CPZ lag bei $2,31 \pm 0,22 \mu\text{M}$ ($n = 8$).

3.1.3. Inhibition durch BL-1249

Im Jahre 2005 wurde BL-1249 als K⁺-Kanalaktivator in den glatten Muskelzellen der Harnblase beschrieben (Tertyshnikova et al., 2005) und bereits 2014 erkannte man seine Wirkung als potenter Aktivator des TREK-1 K_{2P}-Kanals (Veale et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher auch der Effekt von BL-1249 auf den TRESK K_{2P}-Kanal untersucht. Dazu wurde BL-1249 in steigender Konzentration auf den exzidierten Patch appliziert. Der Effekt und der Zeitverlauf der Applikation von verschiedenen BL-1249-Konzentrationen werden in der Abbildung 10 dargestellt. Interessanterweise kam es dabei zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition des TRESK K_{2P}-Kanals, wobei hohe Konzentrationen von BL-1249 nicht zu einer vollständigen Inhibition führten. Da zu Beginn der Messung der Strom mit Tetrapentylammonium (TPenA) vollständig blockiert wurde, kann ein Leckstrom als Ursache für den Reststrom ausgeschlossen werden (Abb. 10 A). Der TRESK K_{2P}-Kanal wurde durch BL-1249 mit einem IC₅₀-Wert von $12,15 \pm 1,21 \mu\text{M}$ inhibiert (Abb. 10 B).

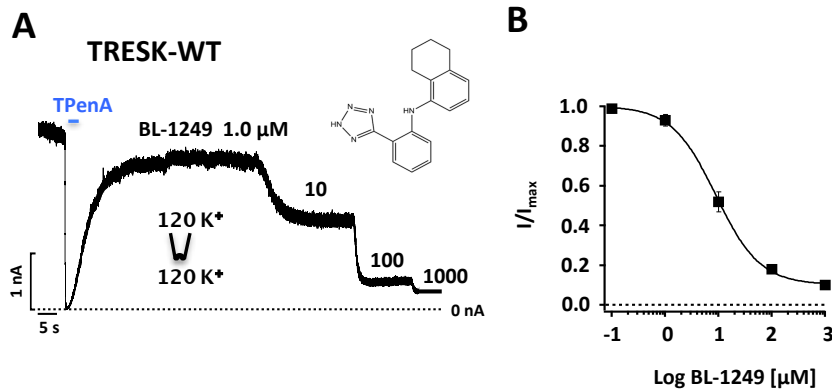


Abbildung 10: Auswirkung von BL-1249 auf den TRESK K_{2P}-Kanal. A) Repräsentativer Stromverlauf des TRESK K_{2P}-Kanals bei der Applikation von BL-1249 auf einen inside-out Patch bei symmetrischen K⁺-Konzentrationen und einer Haltespannung von +40 mV. Die Strukturformel von BL-1249 wird oben rechts dargestellt. B) Dosis-Wirkungsbeziehung für den TRESK-Kanal. Der IC₅₀-Wert für BL-1249 beträgt 12,15 ± 1,21 μM (n = 10).

3.1.4. Wechselwirkung zwischen quartären Ammoniumverbindungen, Chlorpromazin und BL-1249

In der vorliegenden Arbeit wurden auch die Wechselwirkungen zwischen QA-Ionen (TEA und TButA), CPZ und BL-1249 untersucht. Die QA-Ionen sind klassische Porenblocker und binden in den K_{2P}-Kanälen in der Kavität unterhalb des SF. Sie können daher sowohl für die mechanistische Aufklärung als auch für die Ermittlung der Bindungsstellen von Substanzen verwendet werden (Piechotta et al., 2011).

In der Abbildung 11 wird zur Veranschaulichung des Versuchsablaufs eine repräsentative Messung dargestellt. Der Ausgangsstrom des TRESK K_{2P}-Kanals wurde zunächst mit 40 mM TEA über die gesamte Zeitspanne der Messung inhibiert. Anschließend wurde zusätzlich zum TEA CPZ in steigender Konzentration (0,1-100 μM) appliziert. Im Vergleich mit den Messungen ohne TEA erfolgte bei einer Konzentration von 100 μM CPZ keine vollständige Inhibition des Kanals (Abb. 11). Darüber hinaus wurde auch die konzentrationsabhängige CPZ-Wirkung bei einer kontinuierlichen TButA-Applikation (30 μM) untersucht.

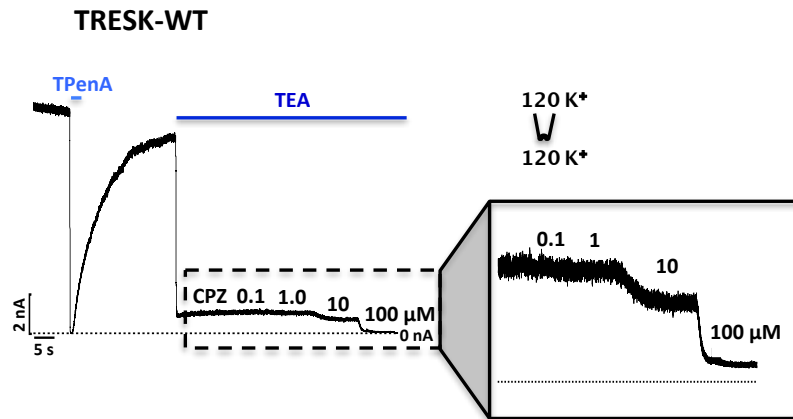


Abbildung 11: Exemplarische Messung der Wechselwirkung zwischen TEA und CPZ. Repräsentativer Stromverlauf des TRESK K_{2P} -Kanals und der Inhibition durch CPZ (0,1-100 μM) bei einer zusätzlichen und kontinuierlichen Applikation von 40 mM TEA; Inside-out Patch bei symmetrischen K^+ -Konzentrationen und einer Haltespannung von +40 mV ($n = 9$).

Sowohl bei einer kontinuierlichen TEA- als auch bei einer kontinuierlichen TButA-Applikation konnte anhand der CPZ-Dosis-Wirkungskurve eine Erhöhung des IC_{50} -Werts auf $17,11 \pm 1,04 \mu\text{M}$ bzw. $16,75 \pm 0,93 \mu\text{M}$ gezeigt werden (Abb. 12).

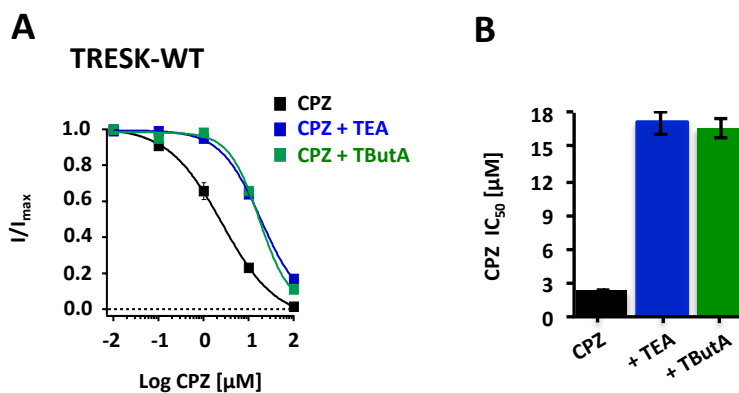


Abbildung 12: Konkurrenz zwischen QA-Ionen und CPZ. **A)** Dosis-Wirkungsbeziehung von CPZ (schwarz), CPZ + TEA 40 mM (blau) und CPZ + TButA 30 μM (grün) für den TRESK-WT K_{2P} -Kanal. TEA 40 mM bzw. TButA 30 μM führten zu einer Hemmung des Grundstroms von ca. 80 % bzw. 84 %. **B)** Darstellung der IC_{50} -Werte von CPZ $2,31 \pm 0,22 \mu\text{M}$ ($n = 8$), CPZ + TEA 40 mM $17,11 \pm 1,04 \mu\text{M}$ ($n = 8$) und CPZ + TButA 30 μM $16,75 \pm 0,93 \mu\text{M}$ ($n = 9$) in einem Balkendiagramm.

Darüber hinaus wurden auch die Wechselwirkungen zwischen QA-Ionen (TEA und TButA) und BL-1249 untersucht, wobei sich die mittlere Inhibitionskonstante von BL-1249 bei der Kombination mit TButA um den Faktor 4,3 auf einen IC_{50} -Wert von $52,21 \pm 2,66 \mu\text{M}$ erhöhte. Im Unterschied dazu war bei BL-1249 in einer Kombination mit TEA keine Verschiebung der halbmaximalen Inhibition zu beobachten (Abb. 13).

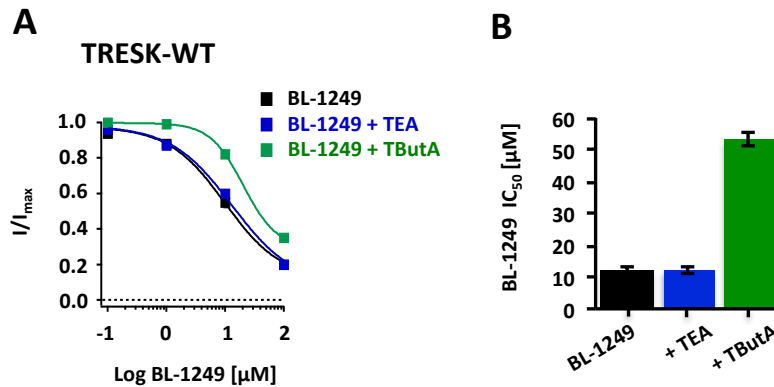


Abbildung 13: Konkurrenz zwischen QA-Ionen und BL-1249. **A)** Dosis-Wirkungsbeziehung von BL-1249 (schwarz), BL-1249 + TEA 40 mM (blau) und BL-1249 + TButA 30 μM (grün) für den TRESK-WT K_{2P} -Kanal. TEA 40 mM bzw. TButA 30 μM führten zu einer Hemmung des Grundstroms von ca. 81 % bzw. 85 %. **B)** Darstellung der IC_{50} -Werte von BL-1249 $12,15 \pm 1,21 \mu M$ ($n = 10$), BL-1249 + TEA 40 mM $11,91 \pm 1,04 \mu M$ ($n = 9$) und BL-1249 + TButA 30 μM $52,21 \pm 2,66 \mu M$ ($n = 12$) in einem Balkendiagramm.

3.1.5. Wirkung von Porenmutationen auf die Inhibitionseffekte von quartären Ammoniumverbindungen, Chlorpromazin und BL-1249

In früheren Arbeiten wurden zwei Phenylalanine (F145/F352) in der Pore von TRESK K_{2P} -Kanälen identifiziert, die wahrscheinlich direkt an der Inhibition der Kanäle durch verschiedene Substanzen (z. B. Loratadin, Bupivacain und Lidocain) beteiligt sind (Kim et al., 2013; Bruner et al., 2014).

Im Folgenden wird die Wirkung der Doppelmutante TRESK-F145/352 auf die von mir untersuchten Inhibitoren (QA-Ionen, Chlorpromazin und BL-1249) dargestellt (Abb. 14 A-F). Auf das kleine Molekül TEA wirkte sich die Doppelmutation (F145A/F352A) kaum aus. Im Unterschied dazu wurde die apparente Affinität von TProA, TButA, CPZ und BL-1249 reduziert und zwar 12,9-fach bei TProA, 18,3-fach bei TButA, 15,4-fach bei CPZ und 18,5-fach bei BL-1249. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die beiden Phenylalanine auch an der Bindung von TProA, TButA, CPZ und BL-1249 beteiligt sind, aber nicht an der Bindung von TEA.

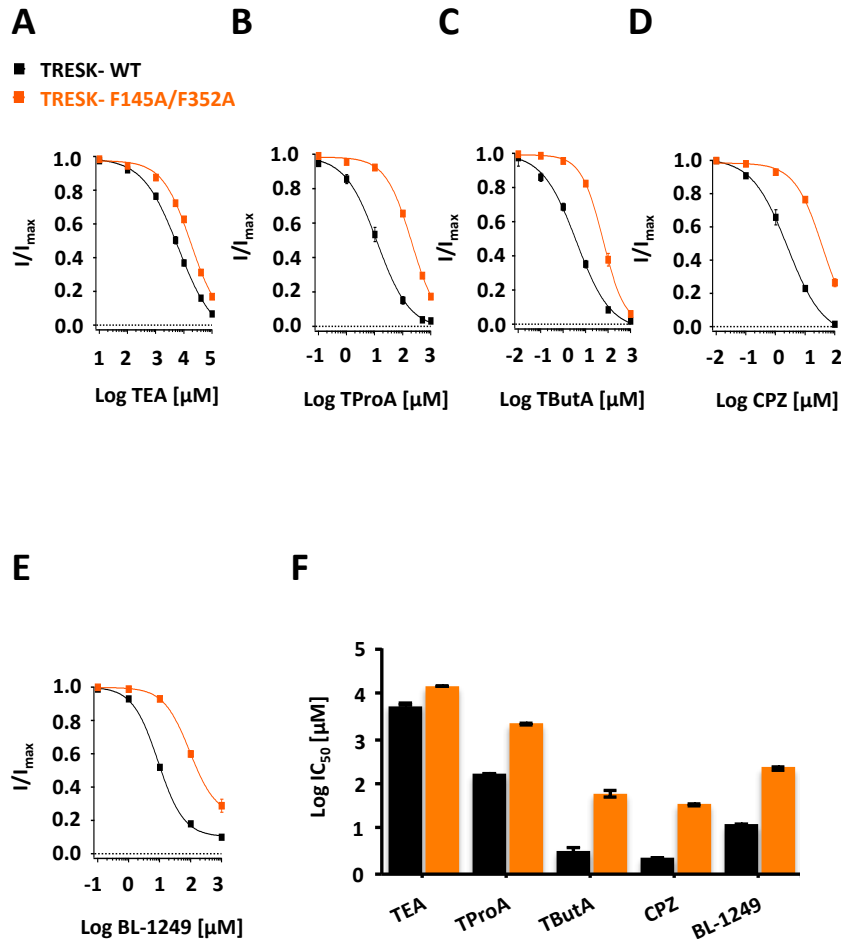


Abbildung 14: Einfluss von QA-Ionen (TEA, TButA), CPZ und BL-1249 auf die TRESK-F145A/F352A-Doppelmutante. **A)** Dosis-Wirkungsbeziehung von TEA, IC_{50} : WT $5550,31 \pm 370,42 \mu\text{M}$ ($n = 5$); F145A/F352A $14496,60 \pm 377,74 \mu\text{M}$ ($n = 4$). **B)** Dosis-Wirkungsbeziehung von TProA, IC_{50} : WT $163,30 \pm 13,21 \mu\text{M}$ ($n = 6$); F145A/F352A $60,81 \pm 9,98 \mu\text{M}$ ($n = 6$). **C)** Dosis-Wirkungsbeziehung von TButA, IC_{50} : WT $3,30 \pm 0,37 \mu\text{M}$ ($n = 5$); F145A/F352A $60,81 \pm 9,98 \mu\text{M}$ ($n = 6$). **D)** Dosis-Wirkungsbeziehung von CPZ, IC_{50} : WT $2,31 \pm 0,22 \mu\text{M}$ ($n = 8$); F145A/F352A $35,41 \pm 2,93 \mu\text{M}$ ($n = 9$). **E)** Dosis-Wirkungsbeziehung von BL-1249, IC_{50} : WT $12,15 \pm 1,21 \mu\text{M}$ ($n = 10$); F145A/F352A $221,97 \pm 26,24 \mu\text{M}$ ($n = 6$). **F)** Darstellung der IC_{50} -Werte von TEA, TProA, TButA, CPZ und BL-1249 an den TRESK-WT $\text{K}_{2\text{P}}$ -Kanälen (schwarz) und TRESK-F145A/F352A-Mutanten (orange) in einem Balkendiagramm.

3.2. Inhibition der TRESK K₂P-Kanäle durch endogene Lipide

Nachdem im ersten Teil der vorliegenden Arbeit einige Pharmaka als TRESK K₂P-Kanalinhibitoren etabliert wurden, wird im folgenden Teil auf die Untersuchung einer inhibitorischen Wirkung von endogenen Lipiden (Arachidonsäure, Anandamid und Dioctanoyl- sn-glycerol) auf den TRESK K₂P-Kanal eingegangen.

3.2.1. Inhibition durch endogene Lipide

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass der TRESK-WT K₂P-Kanal durch eine intrazelluläre Applikation von Arachidonsäure blockiert wird. Eine Inhibition konnte auch bei einer intrazellulären Anwendung von anderen ungesättigten freien Fettsäuren wie Docosahexaensäure, Linolsäure und Oleatinsäure nachgewiesen werden (Sano et al., 2003). Im folgenden Abschnitt wird näher auf diese Ergebnisse und die Untersuchung der Wirkung von Arachidonsäure (AA), Anandamid (AEA) und Dioctanoyl-sn-glycerol (DiC8) eingegangen (Abb. 15).

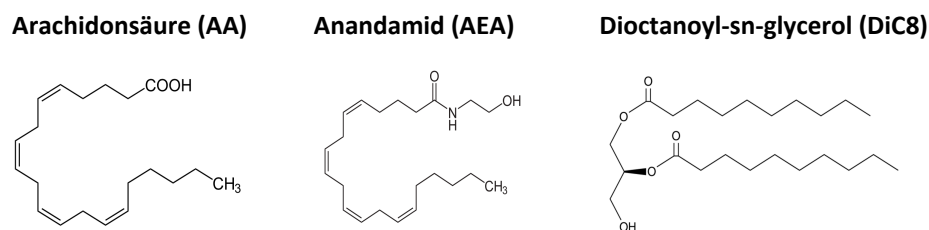


Abbildung 15: Strukturformeln der untersuchten endogenen Lipide. Arachidonsäure (AA), Anandamid (AEA) und Dioctanoyl-sn-glycerol (DiC8).

Eine repräsentative Messung zum Einfluss von Arachidonsäure (AA) in steigender Konzentration (0,1-100 μ M) auf den TRESK-WT K₂P-Kanal wird in Abbildung 16 A exemplarisch dargestellt (Abb. 16 A). Bei Konzentrationen über 0,1 μ M wurde die Kanalaktivität bis zur vollständigen Inhibition bei 100 μ M AA inhibiert. Ähnliche Ergebnisse konnten für AEA und DiC8 nachgewiesen werden. Die Dosis-Wirkungskurven lieferten IC₅₀-Werte von $2,35 \pm 0,51$ μ M für AA, $0,61 \pm 0,14$ μ M für AEA und $6,41 \pm 0,43$ μ M für DiC8 (Abb. 16 B-D).

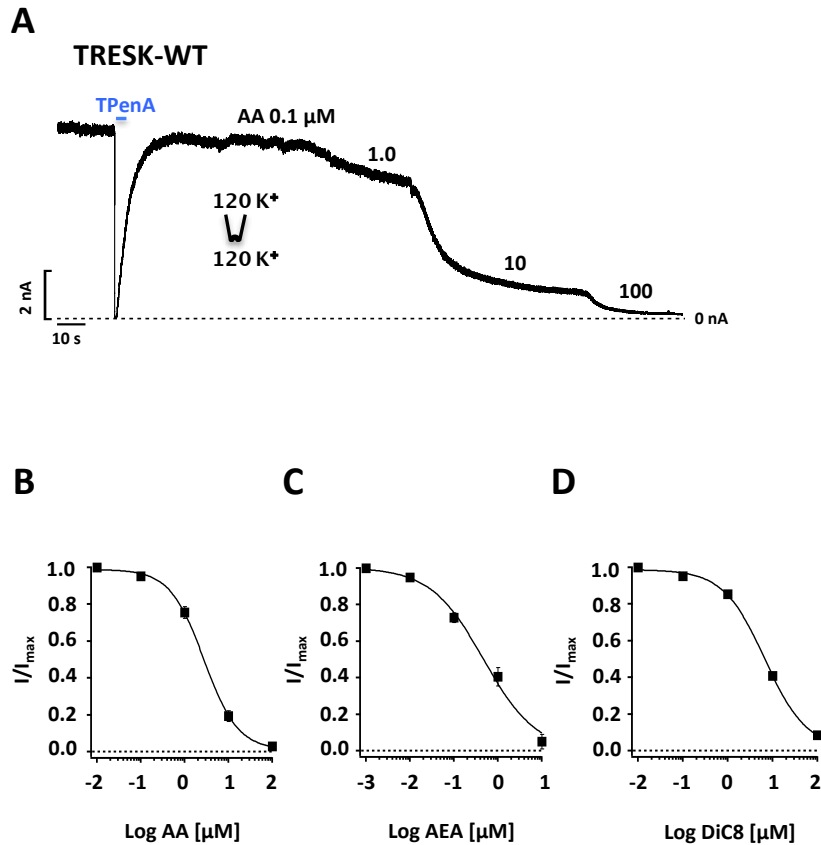


Abbildung 16: Inhibition von TRESK K_{2P}-Kanälen durch Lipide. **A)** Applikation von TPA und AA auf einen inside-out Patch mit TRESK K_{2P}-Kanälen bei einer Haltespannung von +40 mV. **B-D)** Aus den Ergebnissen der Experimente wie in A) wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen erstellt und mit einer Hill-Funktion gefittet; Der IC₅₀-Wert lag für AA bei $2,35 \pm 0,51 \mu\text{M}$ (n = 7), für AEA bei $0,61 \pm 0,14 \mu\text{M}$ (n = 9) und für DiC8 bei $6,41 \pm 0,43 \mu\text{M}$ (n = 8).

3.2.2. Wechselwirkungen zwischen quartären Ammoniumverbindungen und endogenen Lipiden

Die bisherigen Experimente konnten zeigen, dass vermutlich auch die getesteten endogenen Lipide in der Kavität binden können. Anhand der folgenden Experimente werden die Wechselwirkungen zwischen den QA-Ionen (TEA und TButA) und den endogenen Lipiden (AA, AEA und DiC8) dargestellt.

Zur Untersuchung der Competition zwischen einem QA-Ion (TEA und TButA) und einem Lipid (AA, AEA und DiC8) wurde der Ausgangsstrom des TRESK K_{2P}-Kanals mit 40 mM TEA bzw. 30 μM TButA über die gesamte Zeitspanne der Messung um ca. 81 % bzw. 83 % blockiert. Zusätzlich wurden unterschiedliche Konzentrationen von jeweils einem endogenen Lipid appliziert. Die Abbildung 17 zeigt eine repräsentative Messung der Inhibition von TRESK K_{2P}-Kanälen nach der Inhibition durch TEA (Abb. 17).

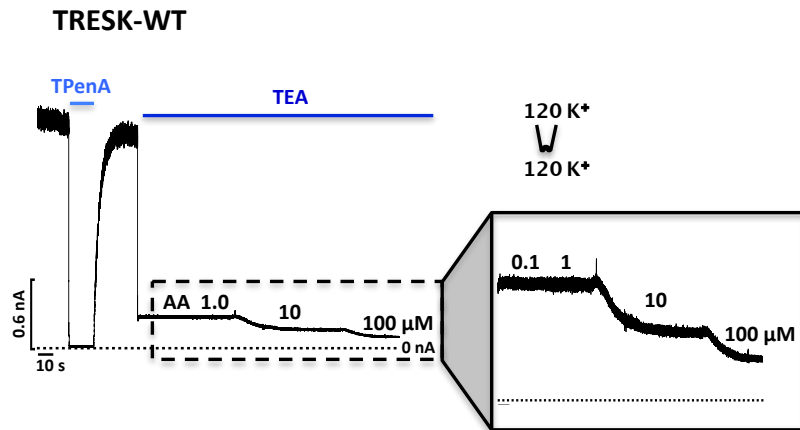


Abbildung 17: Exemplarische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen TEA und AA. Repräsentativer Stromverlauf des TRESK K_{2P} -Kanals und Inhibition durch unterschiedliche AA-Konzentrationen (0,1-100 μM) bei symmetrischen K^+ -Konzentrationen und gleichzeitiger und kontinuierlicher Applikation von 40 mM TEA bei einer Haltespannung +40 mV ($n = 10$).

Die getesteten Lipide traten sowohl mit TEA als auch mit TButA in eine Wechselwirkung. Die IC_{50} -Werte der jeweiligen Lipide (AA, AEA und DiC8) in der Kombination mit TEA und auch der mit TButA wurden ungefähr um denselben Faktor erhöht (ca. 9-fach für QA + AA, ca. 19-fach für QA + AEA und ca. 6-fach für QA + DiC8) (Abb. 18). Diese deutliche Abnahme der apparenten Affinität der Lipide nach der Blockade der Pore durch TEA und TButA verweist auf eine Bindungsstelle der Lipide in der Pore.

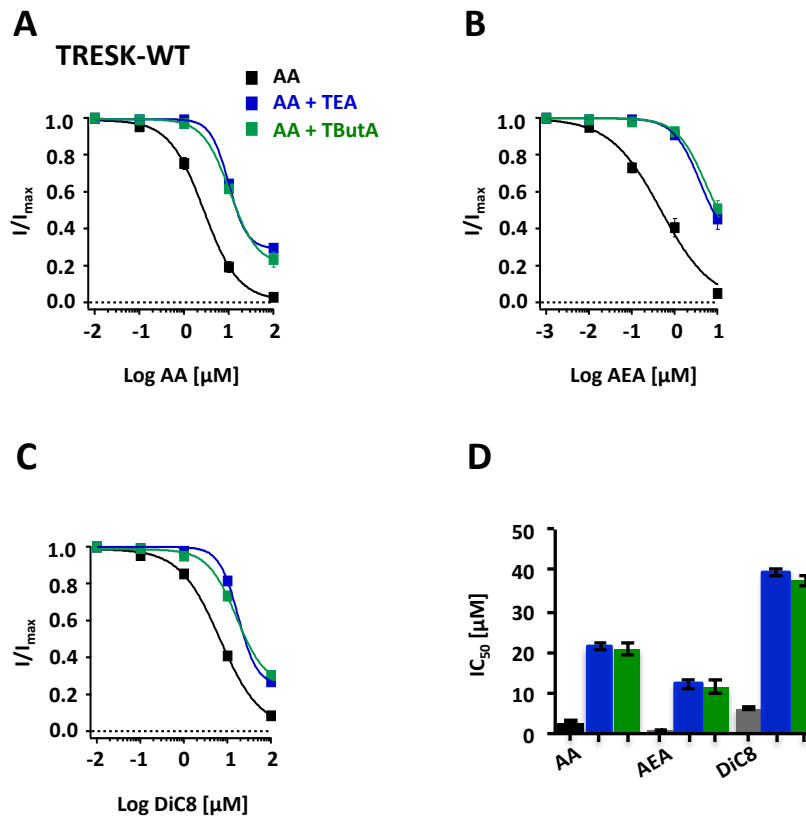


Abbildung 18: Konkurrenz zwischen QA-Ionen (TEA und TButA) und endogenen Lipiden (AA, AEA und DiC8). **A)** Dosis-Wirkungsbeziehung von AA ($IC_{50} = 2,35 \pm 0,51 \mu M$; $n = 7$), AA + TEA 40 mM ($IC_{50} = 23,12 \pm 2,09 \mu M$; $n = 10$) und AA + TButA 30 μM ($IC_{50} = 20,24 \pm 3,36 \mu M$; $n = 5$). **B)** Dosis-Wirkungsbeziehung von AEA ($IC_{50} = 0,61 \pm 0,14 \mu M$; $n = 9$), AEA + TEA 40 mM ($IC_{50} = 12,59 \pm 3,93 \mu M$; $n = 7$) und AEA + TButA 30 μM ($IC_{50} = 11,26 \pm 1,87 \mu M$; $n = 6$). **C)** Dosis-Wirkungsbeziehung von DiC8 ($IC_{50} = 6,41 \pm 0,43 \mu M$; $n = 8$), DiC8 + TEA 40 mM ($IC_{50} = 39,61 \pm 2,69 \mu M$; $n = 12$) und DiC8 + TButA 30 μM ($IC_{50} = 36,45 \pm 3,88 \mu M$; $n = 11$). **D)** Darstellung der IC_{50} -Werte von endogenen Lipiden (schwarz), endogenen Lipide + TEA 40 mM (blau) und endogenen Lipide + TButA 30 μM (grün) in einem Balkendiagramm. TEA 40 mM bzw. TButA 30 μM führten zu einer Hemmung des Grundstroms von ca. 81 % bzw. 83 %.

3.2.3. Der Einfluss von Porenmutationen auf die Inhibition von endogenen Lipiden

Außerdem wurde die Wirkung der Punktmutationen F145 und F352 auf die Inhibition von TRESK K_{2P} -Kanälen durch verschiedene Lipide untersucht.

Abbildung 19 stellt die Inhibition der TRESK-F145A/F352A-Kanäle durch endogene Lipide (AA, AEA und DiC8) dar. Diese Doppelmutterante führte bei den untersuchten Lipiden zu einer deutlichen Affinitätsverschiebung, wobei die AA-Affinität um den Faktor 55,23 auf einen IC_{50} -Wert von $127,31 \pm 7,69 \mu M$ verschoben wurde. Auch die AEA-Affinität wurde um den Faktor 19,34 erhöht, was einem IC_{50} -Wert von $11,79 \pm 1,35 \mu M$ entspricht.

Die stärkste Affinitätsänderung erfolgte bei DiC8 mit einer Erhöhung des IC_{50} -Werts um den Faktor 148,44 auf einen IC_{50} -Wert von $950,51 \pm 124,34 \mu M$ (Abb. 19).

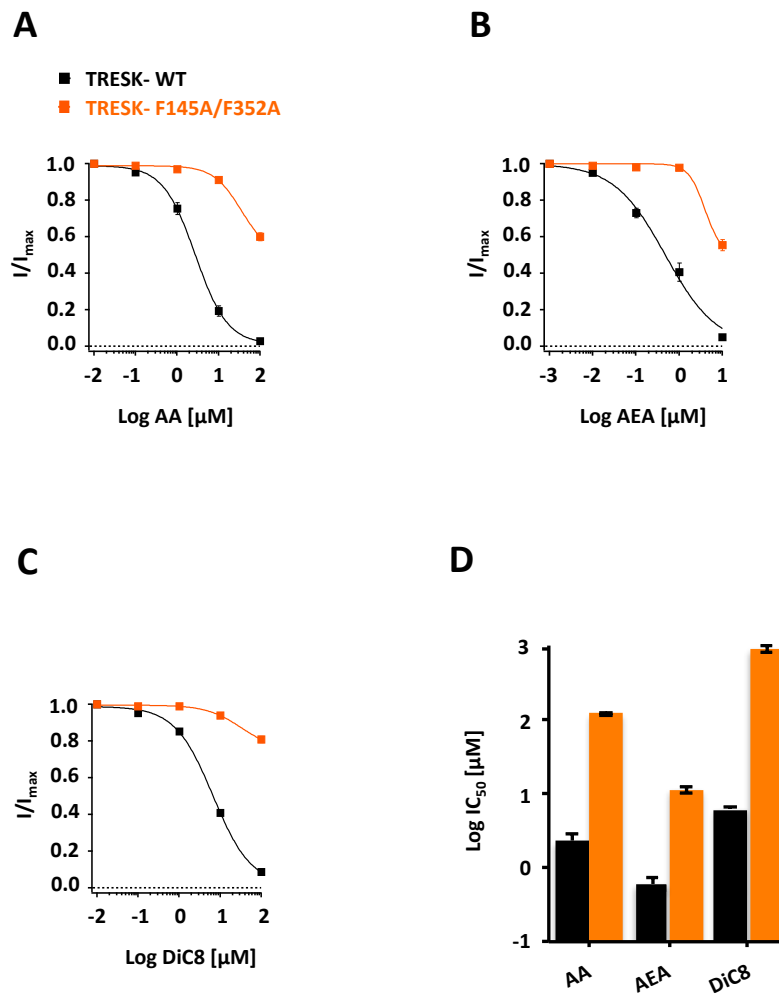


Abbildung 19: Der Einfluss von endogenen Lipiden (AA, AEA und DiC8) auf die TRESK-F145A/F352A-Doppelmutante. **A)** Dosis-Wirkungsbeziehung von AA bei +40 mV, IC_{50} : WT $2,35 \pm 0,51 \mu M$ ($n = 7$); F145A/F352A $127,31 \pm 7,69 \mu M$ ($n = 9$). **B)** Dosis-Wirkungsbeziehung von AEA bei +40 mV, IC_{50} : WT $0,61 \pm 0,14 \mu M$ ($n = 9$); F145A/F352A $11,79 \pm 1,35 \mu M$ ($n = 9$). **C)** Dosis-Wirkungsbeziehung von DiC8 bei +40 mV, IC_{50} : WT $6,41 \pm 0,43 \mu M$ ($n = 8$); F145A/F352A $950,51 \pm 124,34 \mu M$ ($n = 5$). **D)** IC_{50} -Werte von AA, AEA und DiC8 bei den TRESK-WT K_{2P} -Kanal (schwarz) und den TRESK-F145A/F352A-Mutanten (orange) in einem Balkendiagramm.

3.3. Strukturelle Besonderheiten der Inhibitionsmechanismen bei den TRESK K₂P-Kanälen

Um die Beteiligung des SF am Schaltverhalten der Kanäle bei den entsprechenden Substanzen zu untersuchen, wurde im Bereich des SF die Punktmutation an der Position 116 (T116C) generiert. Dabei wurde in früheren Arbeiten gezeigt, dass der SF eine zentrale Schaltstruktur in den Kanälen ist, sodass es bei Mutationen im SF das spannungsabhängige Schaltverhalten, die Regulierung des Membranzugs und die Lipidregulierung aufgehoben werden (Schewe et al., 2016). Ähnliche Effekte wurden auch bei TREK-, TRAAK- und TASK K₂P-Kanälen beobachtet. Diese hochkonservierte Position in den K₂P-Kanälen spielt eine wichtige Rolle beim Spannungs- und Kalium-Flux-Schaltverhalten innerhalb der K₂P-Kanal-Superfamilie (Schewe et al., 2016).

Im Folgenden wird auf die Wirkung dieser Mutation auf die Inhibition von TRESK K₂P-Kanälen durch Inhibitoren und Lipide eingegangen.

3.3.1. Die Bedeutung des SF für die Inhibition durch quartäre Ammoniumverbindungen, Chlorpromazin und BL-1249

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses der TRESK-T116C-Mutante auf TEA, TButA, CPZ und BL-1249 dargestellt. Die T116C-Mutante veränderte die Affinitäten von TEA, TButA und CPZ im Vergleich mit dem TRESK-WT K₂P-Kanal nicht (Abb. 20 C-E). Im Unterschied dazu führte die T116C-Mutante zu einer Verschiebung der BL-1249-Affinität um den Faktor 65 auf einen IC₅₀-Wert von 780 ± 50 μ M (Abb. 20 F).

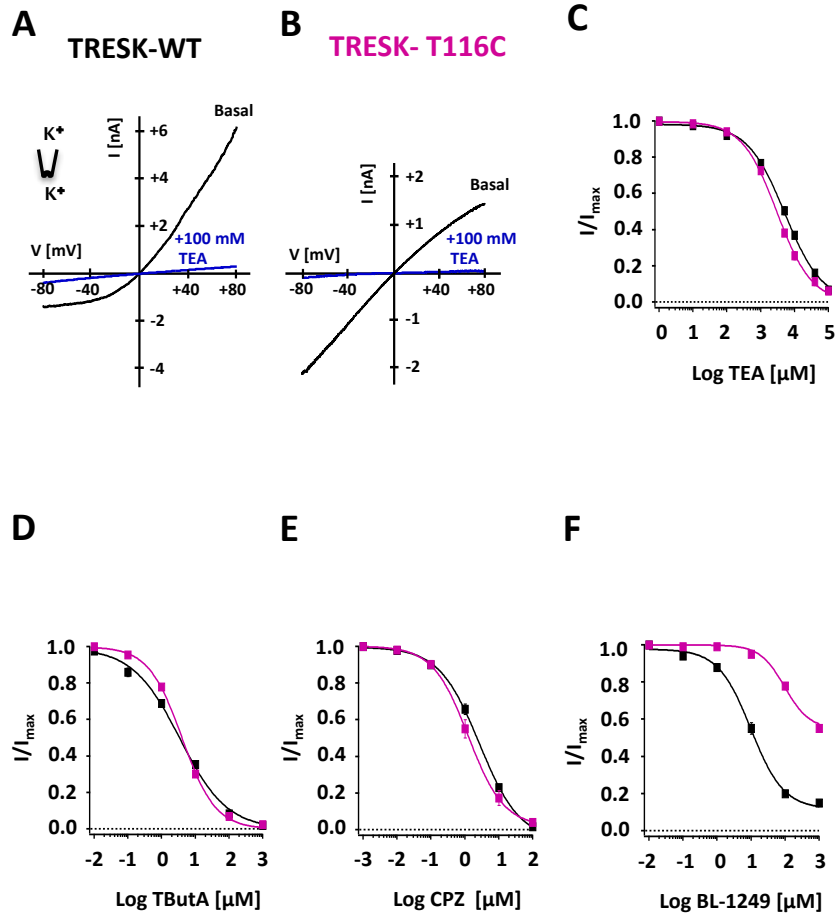


Abbildung 20: Die Auswirkungen von TEA, TButA, CPZ und BL-1249 auf die TRESK-T116C-Mutante.

A) Vollständige Inhibition des TRESK-WT K_{2P} -Kanals mit 100 mM TEA. **B)** Vollständige Inhibition des TRESK-T116C-Kanals mit 100 mM TEA. **C)** Dosis-Wirkungsbeziehung von TEA bei +40 mV, IC_{50} : WT $5550,31 \pm 370,42 \mu M$ ($n = 5$); T116C $4030,91 \pm 320,34 \mu M$ ($n = 13$). **D)** Dosis-Wirkungsbeziehung von TButA bei +40 mV, IC_{50} : WT $3,30 \pm 0,37 \mu M$ ($n = 5$); T116C $3,81 \pm 0,33 \mu M$ ($n = 6$). **E)** Dosis-Wirkungsbeziehung von CPZ bei +40 mV, IC_{50} : WT $2,31 \pm 0,22 \mu M$ ($n = 8$); T116C $1,81 \pm 0,05 \mu M$ ($n = 6$). **F)** Dosis-Wirkungsbeziehung von BL-1249 bei +40 mV, IC_{50} : WT $12,15 \pm 1,21 \mu M$ ($n = 10$); T116C $780,45 \pm 50,64 \mu M$ ($n = 8$).

Zum besseren Vergleich werden in Abbildung 21 die IC_{50} -Werte von TEA, TBA, CPZ und BL-1249 beim TRESK-T116C-Kanal und beim TRESK-WT K_{2P} -Kanal in einem Balkendiagramm gegenübergestellt.

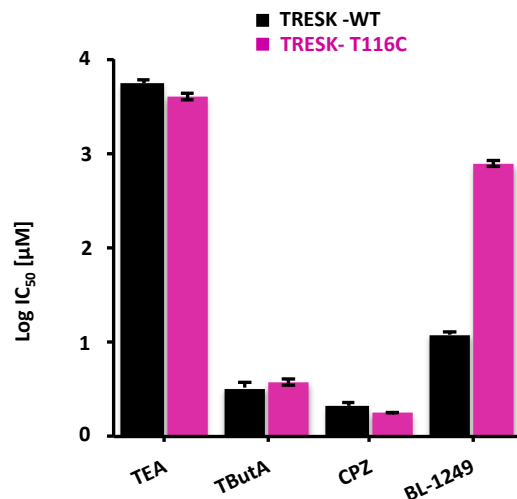


Abbildung 21: Der Einfluss von TEA, TButA, CPZ und BL-1249 auf den TRESK-WT K_{2P} -Kanal und die TRESK-T116C-Mutante. Darstellung der IC_{50} -Werte von TEA, TButA, CPZ und BL-1249 für den TRESK-WT K_{2P} -Kanal (schwarz) und die TRESK-T116C-Mutante (rosa) in einem Balkendiagramm. Die IC_{50} -Werte sind in der Abbildung 20 aufgelistet.

3.3.2. Bedeutung des SF für die Inhibition durch endogene Lipide

Auch die endogenen Lipide (AA, AEA und DiC8) wurden an der T116C-Mutante untersucht. Im Vergleich mit TRESK-WT K_{2P} -Kanal führte die T116C-Mutante zu einer Verschiebung der Affinitäten von AA, AEA und DiC8. Der IC_{50} -Wert für AA lag bei $707,93 \pm 388,0 \mu\text{M}$, der für AEA bei $41,68 \pm 3,73 \mu\text{M}$ und der für DiC8 bei $42,01 \pm 2,42 \mu\text{M}$ (Abb. 22).

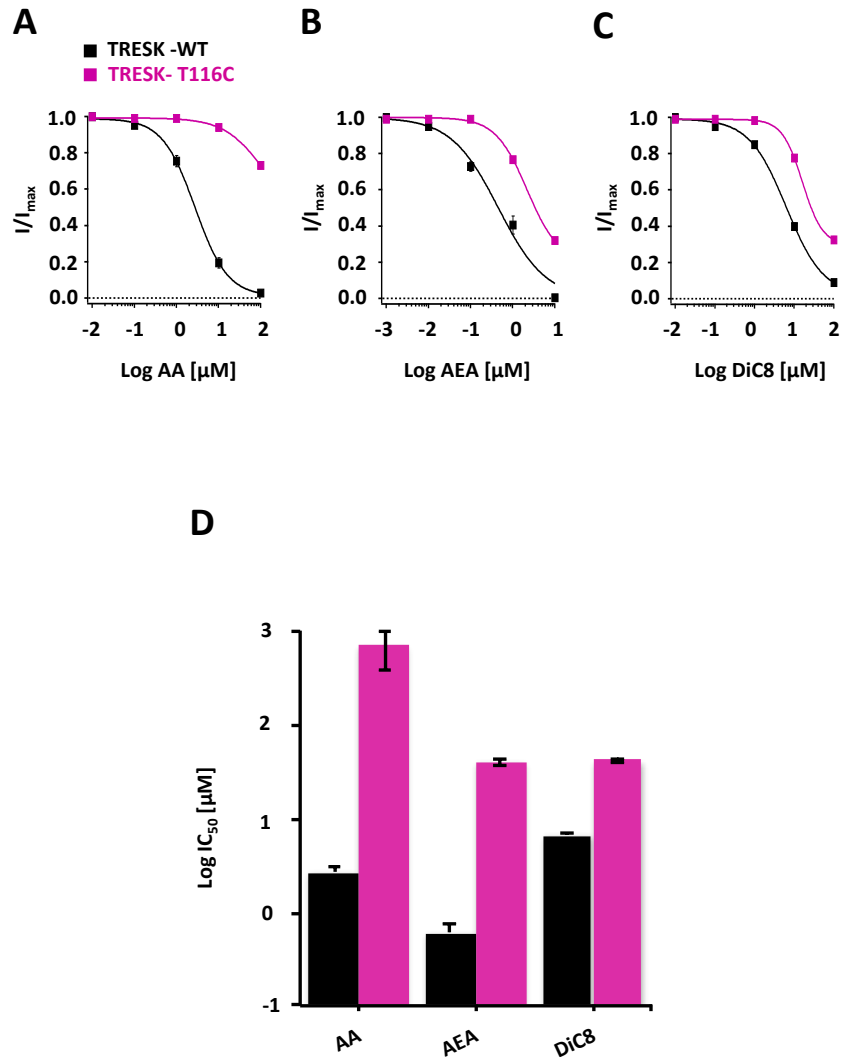


Abbildung 22: Auswirkungen von AA, AEA und DiC8 auf die TRESK-T116C-Mutante. A) Dosis-Wirkungsbeziehung von AA bei +40 mV, IC_{50} : WT $2,35 \pm 0,51 \mu M$ ($n = 7$); T116C $707,93 \pm 388,03 \mu M$ ($n = 5$). **B)** Dosis-Wirkungsbeziehung von AEA bei +40 mV, IC_{50} : WT $0,61 \pm 0,14 \mu M$ ($n = 9$); T116C $41,68 \pm 3,73 \mu M$ ($n = 5$). **C)** Dosis-Wirkungsbeziehung von DiC8 bei +40 mV, IC_{50} : WT $6,41 \pm 0,43 \mu M$ ($n = 8$); T116C $42,01 \pm 2,42 \mu M$ ($n = 7$). **D)** Darstellung der IC_{50} -Werte von AA, AEA und DiC8 für den TRESK-WT K_{2P} -Kanal (schwarz) und für die TRESK-T116C-Mutante (rosa) in einem Balkendiagramm.

4. Diskussion

4.1. Die Wirkung von Pharmaka auf den TRESK K_{2P}-Kanal

K_{2P}-Kanäle werden in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert, in denen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation des Ruhemembranpotentials und der Erregbarkeit von Zellen spielen. In den vergangenen 20 Jahren wurde die Inhibition von TRESK K_{2P}-Kanälen durch unterschiedliche Modulatoren erforscht (Choe, 2002; Enyedi und Czirják, 2010; Feliciangeli et al., 2015). Die Modulation des TRESK K_{2P}-Kanals kann durch verschiedene Substanzen die K⁺-Leitfähigkeit in Zellen verändern, in denen dieser Kanal exprimiert wird. Die gesteigerte K⁺-Leitfähigkeit führt zu einem stärkeren K⁺-Einstrom und damit zu einer Dämpfung der zellulären Erregbarkeit, während die Inhibition der K⁺-Ströme eine verstärkte Erregbarkeit der Zellen bewirkt. Sowohl die Inhibition als auch die Aktivierung des TRESK K_{2P}-Kanals liefern daher einen wichtigen Ansatz zur Beeinflussung der zellulären Erregbarkeit und dadurch auch zur Entwicklung von therapeutischen Optionen für die Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen. Der TRESK K_{2P}-Kanal wird spezifisch in den primären sensomotorischen Neuronen der DRG und des Trigeminalganglions exprimiert, weshalb er vermutlich an der Modulation der physiologischen und auch der pathophysiologischen Nozizeption beteiligt ist (Enyedi und Czirják, 2015; Mathie und Veale, 2015). Wichtige funktionelle Daten, die auf die Bedeutung dieses Kanals als Regulator der zellulären Erregbarkeit in primären sensorischen Neuronen verweisen, konnten durch die Eliminierung und die Überexpression des TRESK K_{2P}-Kanals oder die Verwendung von pharmakologischen Modulatoren der Kanalaktivität erschlossen werden (Dobler et al., 2007; Tulleuda et al., 2011; Guo und Cao, 2014). Sowohl Lafrenière als auch Yang konnten nachweisen, dass die Inhibition des TRESK K_{2P}-Kanalstroms eine Rolle bei der Pathophysiologie von neuropathischen und Migräne-Schmerzen spielt (Lafrenière et al., 2010; Yang et al., 2018). Dabei wurde bereits gezeigt, dass mehrere pharmakologische Substanzen und auch anorganische Modulatoren den TRESK K_{2P}-Kanalstrom hemmen können.

In der vorliegenden Dissertation wurden sowohl bekannte (QA-Ionen) als auch unbekannte (CPZ und BL-1249) TRESK K_{2P}-Kanalinhibitoren verwendet, um zu einem besseren Verständnis des Mechanismus der TRESK K_{2P}-Kanalinhibitoren zu kommen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen in Übereinstimmung mit der Literatur, dass QA-Ionen mit steigender Seitenkettenlänge den TRESK K_{2P} -Kanal mit immer höherer Potenz inhibieren können. Die inhibitorische Potenz hängt also von der Länge der Alkylseitenseitenkette ab. Denn das Stickstoffatom der kurz-kettigen QA-Ionen ist nicht genau in einer zentralen Position lokalisiert, was zu den geringen Affinitäten gegenüber dem TRESK K_{2P} -Kanal führt. Eine Verlängerung der Alkylkette bringt das QA-Ion jedoch an eine zentralere Position innerhalb der vorgeschlagenen Bindungsstelle und ermöglicht so eine zunehmend bessere Interaktion unterhalb des SF. Neben dieser allgemeinen Affinitätssteigerung bei zunehmender Kettenlänge verändert sich auch die Kinetik der TRESK K_{2P} -Kanalhemmung dramatisch (Piechotta et al., 2011). Diese Ergebnisse stimmen insgesamt gut mit unseren experimentellen Daten überein und belegen dadurch auch die Genauigkeit unserer Messungen (Kapitel 3.1.1).

CPZ ist ein typisches Antipsychotikum, das zur Behandlung von Schizophrenie, bipolaren Störungen und akuten Psychosen eingesetzt wird (Mann und Marwaha, 2021). Die Wirkung von CPZ wurde bereits am TREK-1 K_{2P} -Kanal untersucht, wobei allerdings der Wirkmechanismus bisher nicht geklärt werden konnte (Patel et al., 1998). Das Pharmakon BL-1249 kennt man seit 2005 als K^+ -Kanalaktivator in glatten Muskelzellen der Blase und wurde 2014 als ein potenter Aktivator des TREK K_{2P} -Kanals beschrieben ((Tertyshnikova et al., 2005; Veale et al., 2014). Der Wirkmechanismus von BL-1249 wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie der Arbeitsgruppe um Prof. Thomas Baukrowitz am TREK-2 K_{2P} -Kanal untersucht. Dabei ergab sich, dass BL-1249 elektrostatisch die K^+ -Ionenkonzentration in der Kavität erhöht und dadurch zu einer Aktivierung des Kanals führt (Schewe et al., 2019).

Es konnte erstmals nachgewiesen werden, dass sowohl CPZ als auch BL-1249 den TRESK K_{2P} -Kanalstrom im mikromolaren Bereich blockieren (Abb. 9 und 10). Um zu klären, ob auch die untersuchten Pharmaka den TRESK K_{2P} -Kanal über den elektrostatischen Mechanismus inhibieren, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, deren Ergebnisse in den folgenden Abschnitten beschrieben und diskutiert werden.

4.2. Die Wirkung von endogenen Lipiden auf den TRESK K_{2P} -Kanal

Membranlipide spielen eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Kommunikation und der Regulation von K^+ -Kanälen. Die aus der Plasmamembran stammenden Lipide sind an der Modulation der Neuroinflammation beteiligt und fördern dadurch Krankheiten wie Alzheimer, schwere Depression, ischämische Verletzungen, Gehirnalterung und Migräne. Die Membranlipide lösen Signalereignisse aus und spiegeln so den Stoffwechselzustand der Zelle wider. Solche Lipide, wie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2), mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) und ihre Derivate, werden daher schon längere Zeit untersucht. Dabei wurde bereits gezeigt, dass die K_{ir} -Kanäle durch PIP2 aktiviert und durch langkettiges Acyl-Coenzym-A (LcCoA) inhibiert werden (Baukrowitz et al., 1998; Lopes et al., 2002; Schulze et al., 2003; Rapedius et al., 2005; Logothetis et al., 2007). Die Wirkmechanismen sind zwar getrennt, aber dennoch miteinander verbunden, sodass etwa PIP2 durch LcCoA von seiner Bindungsstelle verdrängt wird, ohne den Kanal zu aktivieren (Tucker und Baukrowitz, 2008). Die K_v -Kanäle werden durch langkettige PUFA, einschließlich AA, Docosahexansäure (DHA) und AEA blockiert. Durch einen Mutationsscreen konnte gezeigt werden, dass sie in die Pore des Kanals gelangen, mit hydrophoben Resten in der Kavität interagieren und dadurch den K_v -Kanal inhibieren (Decher et al., 2001).

Demgegenüber sind die strukturellen Voraussetzungen und Mechanismen bei der Lipidregulation der K_{2P} -Kanäle nicht einheitlich. Dabei kann man annehmen, dass das negativ geladene PIP2 in den TREK K_{2P} -Kanälen über einen elektrostatischen Mechanismus mit fünf positiv geladenen Aminosäuren im proximalen C-Terminus interagiert und so den Kanal aktiviert (Chemin et al., 2005).

AEA wird von Neuronen freigesetzt und fungiert als retrograder Botenstoff zur Aktivierung der Cannabinoid-Rezeptoren, um z.B. der TRPV1-Aktivierung entgegenzuwirken und Schmerzen in Situationen zu dämpfen, in denen das Nervensystem erregt ist (Tóth et al., 2009). Eine Zielsetzung der vorliegenden Arbeit besteht darin, die strukturellen Elemente zu identifizieren, die für die Wirkung der endogenen Lipide verantwortlich sind und Hinweise zu den Mechanismen zu erschließen, wie sie das TRESK K_{2P} -Kanalschaltverhalten modulieren.

Deshalb wurden weitere endogene Lipide wie AEA und DiC8 untersucht, deren Wirkung für einige K_{2P} -Kanäle bekannt ist, aber für die TRESK K_{2P} -Kanäle z. T. noch nicht beschrieben wurde. Dabei ist bekannt, dass der TRESK K_{2P} -Kanal durch AA und andere langkettige PUFA gehemmt wird, z. B. durch DHA (Sano et al., 2003). Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass der TRESK-Kanal auch durch das membrandurchlässige DiC8 und das Endocannabinoid AEA gehemmt wird (Abb. 16).

4.3. Der Effekt von Inhibitoren auf die F145A/F352A-TRESK K_{2P} -Kanalmutante

Durch aufgeklärte Kristallstrukturen weiß man mittlerweile mehr über die relevanten Regionen im SF und die strukturelle Lokalisierung von Schaltmechanismen in verschiedenen K_{2P} -Unterfamilien. Bisher wurden für drei Unterfamilien TWIK-, TREK/TRAAK- und TASK-Kristallstrukturen beschrieben.

Dabei zeigte sich, dass die K_{IR} - und die K_V -Kanäle über ein Helix-Bundle-Crossing-Gate (HBC) verfügen, das durch die Kreuzung der TMD4 am Eingang der intrazellulären Pore gebildet wird und den Zugang von K^+ -Ionen zur Pore als eine Reaktion auf verschiedene Modulatoren beeinflusst. Dieses Tor ist allosterisch an den SF gekoppelt und leitet die K^+ -Ionen zur extrazellulären Seite. Im Unterschied dazu fehlt den TREK K_{2P} -Kanälen ein HBC. In der Arbeitsgruppe von Prof. Baukrowitz konnte nachgewiesen werden, dass die Pore auch im inaktiven Zustand offen und für QA-Ionen zugänglich ist (Piechotta et al., 2011; Rapedius et al., 2012). Diese Ergebnisse konnten durch die spätere Aufklärung der Kristallstrukturen bestätigt werden und ermöglichen einen Vergleich von TMD2- und TMD4-Konformationen in offenen und geschlossenen K_{2P} -Kanälen, z. B. TRAAK (Brohawn et al., 2013), TREK-2 (Dong et al., 2015) und TREK-1 (Lolicato et al., 2017).

Die K_{2P} -Kanäle werden demgegenüber am SF als primäre Schaltstruktur angesteuert. Die Mutationen in der Nähe der S4- K^+ -Bindungsstelle beeinflussen die Aktivierung der TREK K_{2P} -Kanäle stark (Piechotta et al., 2011). Der SF konnte anschließend durch Mutationsstudien als eine gemeinsame molekulare Schaltstruktur für aktivierende und hemmende Modulatoren identifiziert werden (Bagriantsev et al., 2011).

Interessanterweise konnte kürzlich in TASK-1 K_{2P} -Kanälen eine zusätzliche Konstriktion am intrazellulären Poreneingang nachgewiesen werden, die als ‚X-Gate‘ bezeichnet

wurde. Dadurch konnte eine zweite Barriere für die Ionenpermeation über den SF hinaus beschrieben werden. Nach den Autoren handelt es sich dabei um eine räumliche Einschnürung, die in der TREK/TRAAK-Unterfamilie nicht vorkommt und Blocker in der Pore einfangen kann. Mutationen in diesem ‚X-Gate‘ erhöhen die Kanalaktivität und heben die Regulation durch volatile Anästhetika auf (Rödström et al., 2020). Mit dieser Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass es kein universelles Schaltverhalten in allen K_{2P} -Kanälen gibt und die Unterfamilien über unterschiedliche strukturelle Implementierungen eines Gatters verfügen.

Für viele Ionenkanäle wurde das Konzept eines hydrophoben Schaltverhaltens postuliert (Aryal et al., 2015). Auf der Grundlage von MD-Simulationen (molecular dynamics) konnte eine hydrophobe „Manschette“ identifiziert werden, die aus den gegenüberliegenden Resten L146 und L261 besteht (Ben Soussia et al., 2019).

Darüber hinaus wurde in der Pore von TRESK K_{2P} -Kanälen eine Verengung beschrieben, die als allgemeine Inhibitor-Bindungsstelle und/oder für das Schaltverhalten-relevante Struktur fungieren könnte: Mit Computerstudien konnte am TRESK K_{2P} -Kanal ein hydrophober Ring aus vier Phenylalaninen gezeigt werden, die sich in der Porenhöhle befinden und eine Inhibitor-Bindungsstelle mit F145 und F352 bilden (Kim et al., 2013). Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass die π -Stapelwechselwirkungen für die TRESK K_{2P} -Kanalinhibition verantwortlich sind, wobei die F145A/F352A-Doppelmutante die Stromhemmung durch diese Substanzen aufhebt (Lengyel et al., 2018).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die oben genannten Phenylalanine tatsächlich ein Teil der Bindungsstelle oder der für das Schaltverhalten relevanten Struktur im TRESK K_{2P} -Kanal sind. Da bis heute keine Kristallstruktur des TRESK K_{2P} -Kanals beschrieben wurde, wäre eine Modellierung der Pore und eine Identifizierung möglicher für das Schaltverhalten relevanter Reste ein wichtiger Ausgangspunkt für die Entdeckung struktureller Merkmale, die für die Entwicklung neuer Modulatoren für die zukünftige Schmerzbehandlung verwendet werden könnten. Deshalb wurden mehrere Pharmaka und bekannte physiologische Modulatoren von K_{2P} -Kanälen in ihrer Wirkung auf TRESK K_{2P} -Kanäle und die F145A/F352A-Doppelmutanten untersucht. Bei der Doppelmutante ergab sich eine Verschiebung der apparenten Affinität und eine verringerte Hemmung durch die Substanzen im Vergleich mit TRESK-WT K_{2P} -Kanal (siehe Kapitel 3.1.4 und 3.2.2). Die Hemmung durch AA, AEA und DiC8 war bei der F145/F352A-Doppelmutante reduziert, was sich durch die Verschiebung der Affinität zu

höheren IC_{50} -Werten zeigte (Abb. 19). Insbesondere bei DiC8 konnte ein ausgeprägter Effekt nachgewiesen werden (ca. 184,44-fach im Vergleich mit dem TRESK-WT K_{2P} -Kanal). Im Vergleich damit beeinflusste die F145A/F352A-Mutante die TEA-Affinität nur geringfügig mit einer 2- bis 3-fachen Verschiebung, weil TEA wegen der kürzeren Alkylreste nur eine geringere hydrophobe Interaktion mit Phenylalanin eingehen kann (Abb. 14 A).

In Übereinstimmung mit veröffentlichten Ergebnissen stützen die Ergebnisse zur Mutagenese stark die Annahme, dass die Phenylalanine F145/F352 an der Bindungsstelle für die untersuchten Substanzen beteiligt sind.

4.4. Der Wirkmechanismus von Inhibitoren am TRESK K_{2P} -Kanal

Trotz der Fortschritte beim Verständnis der molekularen Pharmakologie von K_{2P} -Kanalinhibitoren weiß man aktuell noch wenig über die Inhibitionsmechanismen und das Schaltverhalten von TRESK K_{2P} -Kanälen. Wie in den Kapiteln 3.1.5 und 3.2.3 dargestellt wurde, werden QA-Ionen, wie TEA und TButA, zur Aufklärung der Porenstruktur und des Schaltverhaltens auch von TRESK K_{2P} -Kanälen verwendet. Piechotta und Kolleg*innen konnten dabei bereits durch QA-Ionen den Block von K_{2P} -Kanälen und ihre Bindungsstelle beschreiben (Piechotta et al., 2011).

Zur weiteren Eingrenzung der Inhibitor-Bindungsstelle und zur Aufklärung des Wirkmechanismus wurden in der vorliegenden Arbeit Konkurrenzexperimente mit TEA und TButA und verschiedenen anderen Substanzen durchgeführt, deren Bindungsstellen nicht bekannt sind. QA-Ionen sind klassische Porenblocker und binden in der Porenkavität unterhalb des SF (Piechotta et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Gegenwart von QA-Ionen zu einer entsprechenden Veränderung der apparenten Affinität von endogenen Lipiden (AA, AEA und DiC8) und CPZ führen (Abb. 12 und 19). Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch die untersuchten Lipide und CPZ in der Porenkavität des TRESK K_{2P} -Kanals binden und eine überlappende Bindungsstelle mit den QA-Ionen wahrscheinlich ist. Eine Ausnahme ergab sich hier allerdings bei BL-1249. Dabei konnte gezeigt werden,

dass die BL-1249-Inhibition von TRESK K_{2P} -Kanälen nur durch TButA, aber nicht durch TEA antagonisiert wird (Abb. 13). Während sich mit TEA die Bindungsstellen nicht überlappen, ist TButA größer, sodass es ein wesentlich größeres Volumen in der Pore einnimmt. BL-1249 liegt damit innerhalb des sphärischen Volumens von TButA, aber außerhalb des kleineren TEAs ähnlich wie im TREK-2 K_{2P} -Kanal, bei dem auch nur ein Überlappen von BL-1249 mit dem größeren Tetrahexylammonium (THexA) aber nicht mit TEA nachgewiesen werden konnte (Abb. 23) (Schewe et al., 2019).

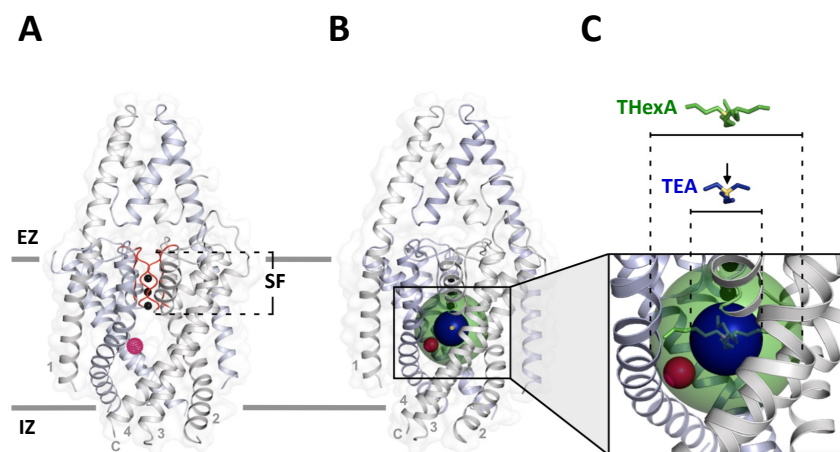


Abbildung 23: Darstellung der BL-1249-Bindungsstelle im TREK-2 K_{2P} -Kanal im Vergleich mit THexA und TEA. (A) Die Struktur zeigt den TREK K_{2P} -Kanal, wobei die rosa Kugeln die Positionen der Bromatome in einem bromierten BL-1249-Molekül (BL-1249-Br) darstellen, das man durch die Kristallisation von TREK-2 K_{2P} -Kanal und BL-1249-Br erhalten hatte. Die K^+ -Ionen werden schwarz dargestellt. **(B)** Die gleiche Struktur ergibt sich auch bei sphärischen Darstellungen von THexA (grün) und TEA (blau) mit ihren zentralen Stickstoffatomen (gelb). Die Br-Atome (rosa) liegen innerhalb der Sphäre von THexA, aber nicht innerhalb der von TEA (modifiziert nach Schewe et al., 2019).

Ausgehend von dieser Annahme wurde in der vorliegenden Arbeit Threonin 116 im Selektivitätsfilter zu Cystein (T116C) mutiert, um weiter die Beteiligung des SF zu untersuchen. In den früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass Mutationen im SF innerhalb der K_{2P} -Kanalfamilie das spannungsabhängige Schaltverhalten, die Regulierung durch Membrandehnung und die Lipidregulierung reduziert, da die Kanäle permanent geöffnet sind und eine zusätzliche Modulierung über den SF vermindert ist (Schewe et al., 2016). Es konnte nachgewiesen werden, dass T116C im TRESK K_{2P} -Kanal keinen Einfluss auf das Verhalten/Affinität von klassischen Porenblockern (TEA und TButA) und CPZ hat.

Im Unterschied dazu zeigten BL-1249 und endogene Lipide (AA, AEA und DiC8) eine deutliche Abschwächung der Inhibition bei der TRESK-T116C-Mutante (Abb. 20 F und

22). Diese Beobachtung weist auf eine allosterische Inhibition von TRESK K_{2P} -Kanälen hin, da ein Porenblock in der zentralen Kavität nicht durch Mutationen im SF beeinflusst werden sollte, wie es bei den QA-ionen der Fall ist. Die Ergebnisse der Konkurrenzexperimente und die der Messungen an der TRESK-T116C-Mutante stimmen dahingehend überein und legen die Vermutung nahe, dass BL-1249 und die untersuchten endogenen Lipide (AA, AEA und DiC8) in der Porenkavität binden und über einen allosterischen Inhibitionsmechanismus mündend auf den SF die Ionenpermeation stören. Rinne und Kolleg*innen konnten die molekularen Grundlagen für einen ähnlichen und neuartigen Inhibitionsmechanismus für TASK-1 und TASK-3 K_{2P} -Kanäle beschreiben, der allosterisch und spannungsabhängig funktioniert. Dabei wurde gezeigt, dass Bupivacain seitlich in der Porenkavität des TASK-1 und TASK-3 K_{2P} -Kanals bindet und über einen allosterischen Inhibitionsmechanismus das Schaltverhalten beeinträchtigt (Rinné et al., 2019).

Für TRESK K_{2P} -Kanäle wurden bisher keine kristallographischen Strukturen gelöst, aber die vermuteten Bindungsstellen und die hier erstmals gezeigten Evidenzen für einen allosterischen Inhibitionsmechanismus ermöglicht ein besseres Verständnis über die Struktur des TRESK K_{2P} -Kanals. Wie bereits Rinné und Kolleg*innen für den TASK-1 und TASK-3 K_{2P} -Kanal spekulierten, ist die Bindungsstelle in der Seitenfenestrierung ein potenziell interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen (Rinné et al., 2019). Man kann davon ausgehen, dass auch TRESK K_{2P} -Kanäle seitliche Fenestrierungen der Porenkavität haben, sodass die Bindung von BL-1249 und endogenen Lipiden (AA, AEA, DiC8) allosterisch das spannungsabhängigen K^+ -Fluss-Schaltverhalten blockieren kann. Diese Seitenfenster könnten die molekulare Basis für neuartige und für TRESK K_{2P} -Kanäle spezifische Inhibitoren bilden.

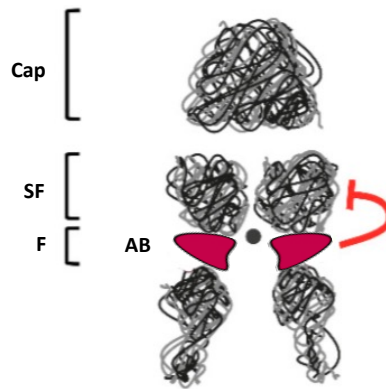


Abbildung 24: Schematische Darstellung des allosterischen Inhibitionsmechanismus bei einem TRESK K_{2P} -Kanal. Diese Abbildung gibt die Konformation des SF an. Das Vorhandensein von allosterischen Blockern (AB) in den Seitenfenestrierungen (F) verhindert das K^+ -Flux-Schaltverhalten durch eine Störung der K^+ -Ionen-Belegung im SF, was zu reduzierten Auswärtsströmen führt (modifiziert nach Rinné et al., 2019).

Die vorliegenden Ergebnisse könnten dabei helfen, neuartige Modulatoren von TRESK K_{2P} -Kanal zu entwickeln, die hochselektiv und wirksam sind und als prophylaktische Medikamente verwendet werden könnten. Da der TRESK K_{2P} -Kanal entfernt mit anderen K_{2P} -Kanälen verwandt ist, sollte es auch möglich sein, hochselektive TRESK K_{2P} -Kanalregulatoren zu entwickeln. Die Herausforderung wird dabei darin bestehen, zusammengesetzte TRESK K_{2P} -Kanalmodulatoren zu entwickeln, ohne unerwünschte Nebenwirkungen zu verstärken.

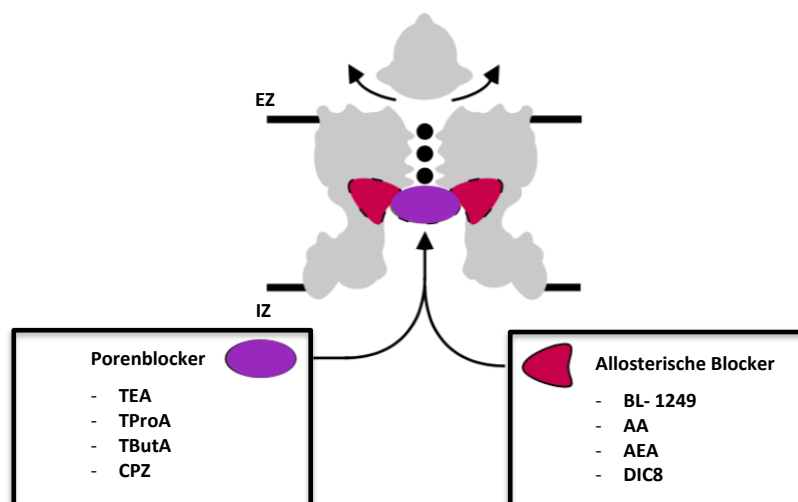


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Bindungsstellen der Porenblocker (lila) und der allosterischen Blocker (rot) im Vergleich. Während die Porenblocker (TEA, TProA, TButA und CPZ) in der Porenkavität unterhalb des SF binden, liegt die Bindungsstelle der allosterischen Blocker (BL-1249, AA, AEA und DiC8) in der Seitenfenestrierung.

5. Zusammenfassung

Bei Säugetieren wird die Vielzahl derzeit bekannter K^+ -Kanäle in 4 große Familien zusammengefasst. Dazu zählen spannungsregulierte (K_v -Kanäle), einwärts-gleichrichtenden (K_{ir} -Kanäle), Ca^{2+} -aktivierte ($K_{Ca^{2+}}$ -Kanäle) und Zwei-Porendomänen (K_{2P} -Kanäle) Kaliumkanäle. Sie sind an zahlreichen zellulären Funktionen des Körpers beteiligt, wie der K^+ -Homöostase, der Zellvolumenregulierung, der zellulären Erregbarkeit und der Zellproliferation. Neben ihrer entscheidenden Rolle bei der Einstellung des Ruhemembranpotentials regulieren sie darüber hinaus die zelluläre Erregbarkeit durch Modulierung von Aktionspotentialen. Dies ist beispielsweise von Bedeutung für Neurone, bei denen Kaliumströme der Membrandepolarisation entgegenwirken, die zuvor durch exzitatorische Kationenströme, wie von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen verursacht wird.

Unter den verschiedenen K^+ -Kanalfamilien wurde die Familie der K_{2P} -Kanäle als letzte identifiziert und erstmals beschrieben. Die insgesamt 15 bekannten K_{2P} -Kanäle werden nach ihren strukturellen und funktionellen Eigenschaften in sechs Subfamilien unterteilt (TWIK, TREK, TASK, TALK, THIK und TRESK). Besonders TREK K_{2P} -Kanäle werden durch eine Vielzahl von physikalischen und chemischen Faktoren, zellulären Signalkaskaden aber auch pharmakologischen Substanzen in ihrer Aktivität moduliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde der im Rückenmark exprimierte TRESK K_{2P} -Kanal untersucht, der in den Hinterwurzel- und Trigeminusganglien exprimiert ist. Bis heute ist die pharmakologische Regulierung von TRESK K_{2P} -Kanälen wenig untersucht und folglich sind Mechanismen, die das Schaltverhalten und somit die Aktivität der Kanäle bestimmen nicht verstanden. Mittels Patch-clamp Technik wurden TRESK K_{2P} -Kanäle, überexprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten, untersucht und die Wirkung von verschiedenen Substanzen (QA-Ionen, CPZ und BL-1249) und endogenen Lipiden (AA, AEA und DiC8) gemessen. Interessanterweise blockierten alle untersuchten Substanzen dosisabhängig TRESK K_{2P} -Kanäle mit wiederum unterschiedlicher Affinität. Zur ersten Abschätzung potenzieller Bindungsstellen wurden Konkurrenzexperimente mit bekannten Porenblockern und Messungen an Porenmutationen (z. B. F145A/F352A-Doppelmutante) durchgeführt. Folglich zeigen die Ergebnisse, dass sowohl untersuchte Substanzen (CPZ und BL-1249), als auch endogene Lipide (AA, AEA und DiC8) im Bereich der inneren Porenkavität binden und dadurch TRESK K_{2P} -Kanäle inhibieren.

Weitere Patch-clamp Messungen an TRESK K_{2P} -Kanälen mit Mutationen im Selektivitätsfilter (T116C) legen zudem nahe, dass BL-1249 und endogene Lipide keine direkte Porenokklusion verursachen, sondern durch eine mehr laterale Bindung in der inneren Porenkavität zu einer allosterischen Inhibition/Inaktivierung des SF von TRESK K_{2P} -Kanälen führen.

TRESK K_{2P} -Kanäle stellen interessante Zielproteine für die Entwicklung von neuen pharmakologischen Substanzen dar, da sie mitunter im Pathogenese-Weg von bestimmten Formen der Migräne von Bedeutung sind. Darüber hinaus könnten zukünftig Modulatoren von TRESK K_{2P} -Kanälen möglicherweise auch bei anderen Schmerzformen eingesetzt werden.

6. Summary

Four major mammalian K^+ channels have been identified based on their structural and functional properties: voltage-gated K_v channels, inward-rectifying K_{ir} channels, calcium-activated K_{Ca2^+} channels and the two-pore domain potassium (K_{2P}) channels. These channels are involved in numerous cellular functions, such as K^+ -homeostasis, cell volume regulation, cellular excitability and proliferation. In addition to their role in regulating the resting membrane potential, K_{2P} channels regulate cellular excitability. This is particularly important in neurons, where potassium currents counteract the depolarisation caused by other excitatory Na^+ , Ca^{2+} or nonselective cation channels. Thus, the potassium channels can regulate neuronal excitability and influence the action potential.

Among the various K^+ -channel families, the K_{2P} channel family was the last to be identified and described. The 15 known K_{2P} channels are classified into six subfamilies (TWIK, TREK, TASK, TALK, THIK and TRESK) based on their structural and functional properties. These channels are regulated by a variety of physicochemical factors and signaling pathways. The best investigated K_{2P} channel is the polymodal-regulated TREK-1.

In this work TRESK K_{2P} channels and their regulation were examined. Expression of this channel is most common in the dorsal root and trigeminal ganglia. To date, no mechanism of TRESK channel gating has been described in molecular detail, especially pharmacological activation/Inhibition is poorly understood.

Here, the effect of various substances (QA ions, CPZ and BL-1249) and endogenous lipids (AA, AEA and DiC8) on TRESK channel activity was examined using the patch-clamp technique. Interestingly, all investigated substances showed a marked inhibiting effect on TRESK channels with varying apparent affinities. Subsequently, competition experiments with established pore blockers (QA ions) and measurements of TRESK F145A/F352A mutant channels were carried out to clarify the binding site of these substances in the TRESK channel. My results suggest that both the compounds (CPZ and BL-1249) and endogenous lipids (AA, AEA and DiC8) bind to the pore cavity and inhibit the TRESK channel by direct pore occlusion.

Furthermore, patch-clamp measurements on TRESK T116C mutant channels provided further insights into the mechanism of action of CPZ, BL-1249 and endogenous lipids, such as AA, AEA and DiC8. T116C mutant channels show a dramatic reduction of the apparent

affinity of these compounds in direct comparison to QA inhibition pointing to a different binding site and an allosteric mechanism of ion permeation inhibition to SF closure.

TRESK channels represent an interesting target for pharmacological manipulation hence their implication in migraine pathogenesis. Further investigations may lead to new approaches for the treatment of migraine headaches and other forms of pain in humans.

7. Quellenverzeichnis

- Armstrong, C. M. (1966). Time course of TEA(+)-induced anomalous rectification in squid giant axons. *J Gen Physiol*, 50(2), 491-503.
- Aryal, P., Sansom, M. S. und Tucker, S. J. (2015). Hydrophobic gating in ion channels. *J Mol Biol*, 427(1), 121-130.
- Bagriantsev, S. N., Peyronnet, R., Clark, K. A., Honoré, E. und Minor, D. L., Jr. (2011). Multiple modalities converge on a common gate to control K2P channel function. *Embo j*, 30(17), 3594-3606.
- Baukrowitz, T., Schulte, U., Oliver, D., Herlitze, S., Krauter, T., Tucker, S. J., Ruppersberg, J. P. und Fakler, B. (1998). PIP2 and PIP as determinants for ATP inhibition of KATP channels. *Science*, 282(5391), 1141-1144.
- Baukrowitz, T. und Yellen, G. (1996). Use-dependent blockers and exit rate of the last ion from the multi-ion pore of a K⁺ channel. *Science*, 271(5249), 653-656.
- Ben Soussia, I., El Mouridi, S., Kang, D., Leclercq-Blondel, A., Khoubza, L., Tardy, P., Zaroghi, N., Gendrel, M., Lesage, F., Kim, E. J., Bichet, D., Andrini, O. und Boulin, T. (2019). Mutation of a single residue promotes gating of vertebrate and invertebrate two-pore domain potassium channels. *Nat Commun*, 10(1), 787.
- Brohawn, S. G., Campbell, E. B. und 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(6), 2129-2134.
- Brohawn, S. G., del Mármol, J. und MacKinnon, R. (2012). Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K⁺ ion channel. *Science*, 335(6067), 436-441.
- Bruner, J. K., Zou, B., Zhang, H., Zhang, Y., Schmidt, K. und Li, M. (2014). Identification of novel small molecule modulators of K2P18.1 two-pore potassium channel. *Eur J Pharmacol*, 740, 603-610.
- Cha, A., Snyder, G. E., Selvin, P. R. und Bezanilla, F. (1999). Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature*, 402(6763), 809-813.
- Chemin, J., Patel, A. J., Duprat, F., Lauritzen, I., Lazdunski, M. und Honoré, E. (2005). A phospholipid sensor controls mechanogating of the K⁺ channel TREK-1. *Embo j*, 24(1), 44-53.
- Choe, S. (2002). Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci*, 3(2), 115-121.
- Czirják, G. und Enyedi, P. (2006). Targeting of calcineurin to an NFAT-like docking site is required for the calcium-dependent activation of the background K⁺ channel, TRESK. *J Biol Chem*, 281(21), 14677-14682.
- Czirják, G., Vuity, D. und Enyedi, P. (2008). Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 proteins controls TRESK regulation. *J Biol Chem*, 283(23), 15672-15680.
- Decher, N., Maier, M., Dittrich, W., Gassenhuber, J., Brüggemann, A., Busch, A. E. und Steinmeyer, K. (2001). Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. *FEBS Lett*, 492(1-2), 84-89.
- Dobler, T., Springauf, A., Tovornik, S., Weber, M., Schmitt, A., Sedlmeier, R., Wischmeyer, E. und Döring, F. (2007). TRESK two-pore-domain K⁺ channels constitute a significant component of background potassium currents in murine dorsal root ganglion neurones. *J Physiol*, 585(Pt 3), 867-879.
- 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. und Carpenter, E.

- P. (2015). K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science*, 347(6227), 1256-1259.
- Doupnik, C. A., Davidson, N. und Lester, H. A. (1995). The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol*, 5(3), 268-277.
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. und MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 280(5360), 69-77.
- Dumont, J. N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology*, 136(2), 153-179.
- Enyedi, P., Braun, G. und Czirják, G. (2012). TRESK: the lone ranger of two-pore domain potassium channels. *Mol Cell Endocrinol*, 353(1-2), 75-81.
- Enyedi, P. und Czirják, G. (2010). Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev*, 90(2), 559-605.
- Enyedi, P. und Czirják, G. (2015). Properties, regulation, pharmacology, and functions of the K_{2p} channel, TRESK. *Pflugers Arch*, 467(5), 945-958.
- Feliciangeli, S., Chatelain, F. C., Bichet, D. und Lesage, F. (2015). The family of K2P channels: salient structural and functional properties. *J Physiol*, 593(12), 2587-2603.
- Ficker, E., Taglialatela, M., Wible, B. A., Henley, C. M. und Brown, A. M. (1994). Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science*, 266(5187), 1068-1072.
- Guo, Z. und Cao, Y. Q. (2014). Over-expression of TRESK K(+) channels reduces the excitability of trigeminal ganglion nociceptors. *PLoS One*, 9(1), e87029.
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stühmer, W. und Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57(4), 473-508.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. und Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 391(2), 85-100.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I. und Kurachi, Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*, 90(1), 291-366.
- Ho, K., Nichols, C. G., Lederer, W. J., Lytton, J., Vassilev, P. M., Kanazirska, M. V. und Hebert, S. C. (1993). Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature*, 362(6415), 31-38.
- Honoré, E. (2007). The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci*, 8(4), 251-261.
- Kamb, A., Tseng-Crank, J. und Tanouye, M. A. (1988). Multiple products of the *Drosophila* Shaker gene may contribute to potassium channel diversity. *Neuron*, 1(5), 421-430.
- Kang, D., Han, J. und Kim, D. (2006). Mechanism of inhibition of TREK-2 (K2P10.1) by the Gq-coupled M3 muscarinic receptor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291(4), C649-656.
- Kang, D. und Kim, D. (2004). Single-channel properties and pH sensitivity of two-pore domain K⁺ channels of the TALK family. *Biochem Biophys Res Commun*, 315(4), 836-844.
- Kang, D., Kim, G. T., Kim, E. J., La, J. H., Lee, J. S., Lee, E. S., Park, J. Y., Hong, S. G. und Han, J. (2008). Lamotrigine inhibits TRESK regulated by G-protein coupled receptor agonists. *Biochem Biophys Res Commun*, 367(3), 609-615.

- Keshavaprasad, B., Liu, C., Au, J. D., Kindler, C. H., Cotten, J. F. und Yost, C. S. (2005). Species-specific differences in response to anesthetics and other modulators by the K2P channel TREK. *Anesth Analg*, 101(4), 1042-1049.
- Kim, S., Lee, Y., Tak, H. M., Park, H. J., Sohn, Y. S., Hwang, S., Han, J., Kang, D. und Lee, K. W. (2013). Identification of blocker binding site in mouse TREK by molecular modeling and mutational studies. *Biochim Biophys Acta*, 1828(3), 1131-1142.
- Kollert, S., Dombert, B., Döring, F. und Wischmeyer, E. (2015). Activation of TREK channels by the inflammatory mediator lysophosphatidic acid balances nociceptive signalling. *Sci Rep*, 5, 12548.
- Kubo, Y., Baldwin, T. J., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*, 362(6416), 127-133.
- Lafrenière, R. G., Cader, M. Z., Poulin, J. F., Andres-Enguix, I., Simoneau, M., Gupta, N., Boisvert, K., Lafrenière, F., McLaughlan, S., Dubé, 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. und Rouleau, G. A. (2010). A dominant-negative mutation in the TREK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat Med*, 16(10), 1157-1160.
- Lengyel, M., Czirájk, G. und Enyedi, P. (2018). TREK background potassium channel is not gated at the helix bundle crossing near the cytoplasmic end of the pore. *PLoS One*, 13(5), e0197622.
- Lesage, F. und Barhanin, J. (2011). Molecular physiology of pH-sensitive background K(2P) channels. *Physiology (Bethesda)*, 26(6), 424-437.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G. und Barhanin, J. (1996). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *Embo j*, 15(5), 1004-1011.
- Lesage, F. und Lazdunski, M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279(5), F793-801.
- Liu, C., Au, J. D., Zou, H. L., Cotten, J. F. und Yost, C. S. (2004). Potent activation of the human tandem pore domain K channel TREK with clinical concentrations of volatile anesthetics. *Anesth Analg*, 99(6), 1715-1722.
- Logothetis, D. E., Jin, T., Lupyán, D. und Rosenhouse-Dantsker, A. (2007). Phosphoinositide-mediated gating of inwardly rectifying K(+) channels. *Pflugers Arch*, 455(1), 83-95.
- Lolicato, M., Arrigoni, C., Mori, T., Sekioka, Y., Bryant, C., Clark, K. A. und Minor, D. L., Jr. (2017). K(2P)2.1 (TREK-1)-activator complexes reveal a cryptic selectivity filter binding site. *Nature*, 547(7663), 364-368.
- Lopes, C. M., Zhang, H., Rohacs, T., Jin, T., Yang, J. und Logothetis, D. E. (2002). Alterations in conserved Kir channel-PIP2 interactions underlie channelopathies. *Neuron*, 34(6), 933-944.
- Lotshaw, D. P. (2007). Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K⁺ channels. *Cell Biochem Biophys*, 47(2), 209-256.
- Loussouarn, G., Rose, T. und Nichols, C. G. (2002). Structural basis of inward rectifying potassium channel gating. *Trends Cardiovasc Med*, 12(6), 253-258.
- Lu, Z., Klem, A. M. und Ramu, Y. (2001). Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature*, 413(6858), 809-813.
- MacKinnon, R. (2004). Nobel Lecture. Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction. *Biosci Rep*, 24(2), 75-100.

- Maljevic, S. und Lerche, H. (2013). Potassium channels: a review of broadening therapeutic possibilities for neurological diseases. *J Neurol*, 260(9), 2201-2211.
- Mann, S. K. und Marwaha, R. (2021). Chlorpromazine. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.
- Matenia, D. und Mandelkow, E. M. (2009). The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci*, 34(7), 332-342.
- Mathie, A. und Veale, E. L. (2015). Two-pore domain potassium channels: potential therapeutic targets for the treatment of pain. *Pflugers Arch*, 467(5), 931-943.
- Matsuda, H., Saigusa, A. und Irisawa, H. (1987). Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg²⁺. *Nature*, 325(7000), 156-159.
- Meech, R. W. (1972). Intracellular calcium injection causes increased potassium conductance in Aplysia nerve cells. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 42(2), 493-499.
- Miller, A. N. und Long, S. B. (2012). Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel K2P1. *Science*, 335(6067), 432-436.
- Neher, E. und Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554), 799-802.
- Noël, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschalier, A. und Lazdunski, M. (2009). The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *Embo j*, 28(9), 1308-1318.
- Oliver, D., Baukrowitz, T. und Fakler, B. (2000). Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur J Biochem*, 267(19), 5824-5829.
- Patel, A. J., Honoré, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F. und Lazdunski, M. (1998). A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *Embo j*, 17(15), 4283-4290.
- Pereira, V., Busserolles, J., Christin, M., Devilliers, M., Poupon, L., Legha, W., Alloui, A., Aissouni, Y., Bourinet, E., Lesage, F., Eschalier, A., Lazdunski, M. und Noël, J. (2014). Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *Pain*, 155(12), 2534-2544.
- Piechotta, P. L., Rapedius, M., Stansfeld, P. J., Bollepalli, M. K., Ehrlich, G., Andres-Enguix, I., Fritzenschaft, H., Decher, N., Sansom, M. S., Tucker, S. J. und Baukrowitz, T. (2011). The pore structure and gating mechanism of K2P channels. *Embo j*, 30(17), 3607-3619.
- Pongs, O., Kecskemethy, N., Müller, R., Krah-Jentgens, I., Baumann, A., Kiltz, H. H., Canal, I., Llamazares, S. und Ferrus, A. (1988). Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of Drosophila. *Embo j*, 7(4), 1087-1096.
- Rapedius, M., Fowler, P. W., Shang, L., Sansom, M. S., Tucker, S. J. und Baukrowitz, T. (2007). H bonding at the helix-bundle crossing controls gating in Kir potassium channels. *Neuron*, 55(4), 602-614.
- Rapedius, M., Schmidt, M. R., Sharma, C., Stansfeld, P. J., Sansom, M. S., Baukrowitz, T. und Tucker, S. J. (2012). State-independent intracellular access of quaternary ammonium blockers to the pore of TREK-1. *Channels (Austin)*, 6(6), 473-478.
- Rapedius, M., Soom, M., Shumilina, E., Schulze, D., Schönherr, R., Kirsch, C., Lang, F., Tucker, S. J. und Baukrowitz, T. (2005). Long chain CoA esters as competitive antagonists of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate activation in Kir channels. *J Biol Chem*, 280(35), 30760-30767.

- Rinné, S., Kiper, A. K., Vowinkel, K. S., Ramírez, D., Schewe, M., Bedoya, M., Aser, D., Gensler, I., Netter, M. F., Stansfeld, P. J., Baukrowitz, T., Gonzalez, W. und Decher, N. (2019). The molecular basis for an allosteric inhibition of K(+)-flux gating in K(2P) channels. *Elife*, 8.
- Rödström, K. E. J., Kiper, A. K., Zhang, W., Rinné, S., Pike, A. C. W., Goldstein, M., Conrad, L. J., Delbeck, M., Hahn, M. G., Meier, H., Platzk, M., Quigley, A., Speedman, D., Shrestha, L., Mukhopadhyay, S. M. M., Burgess-Brown, N. A., Tucker, S. J., Müller, T., Decher, N. und Carpenter, E. P. (2020). A lower X-gate in TASK channels traps inhibitors within the vestibule. *Nature*, 582(7812), 443-447.
- Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Kitada, C., Yokoi, H., Nozawa, K., Okada, H., Matsushime, H. und Furuichi, K. (2003). A novel two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is localized in the spinal cord. *J Biol Chem*, 278(30), 27406-27412.
- Schewe, M., Nematian-Ardestani, E., Sun, H., Musinszki, M., Cordeiro, S., Bucci, G., de Groot, B. L., Tucker, S. J., Rapedius, M. und Baukrowitz, T. (2016). A Non-canonical Voltage-Sensing Mechanism Controls Gating in K2P K(+) Channels. *Cell*, 164(5), 937-949.
- Schewe, M., Sun, H., Mert, Ü., Mackenzie, A., Pike, A. C. W., Schulz, F., Constantin, C., Vowinkel, K. S., Conrad, L. J., Kiper, A. K., Gonzalez, W., Musinszki, M., Tegtmeier, M., Pryde, D. C., Belabed, H., Nazare, M., de Groot, B. L., Decher, N., Fakler, B., Carpenter, E. P., Tucker, S. J. und Baukrowitz, T. (2019). A pharmacological master key mechanism that unlocks the selectivity filter gate in K(+) channels. *Science*, 363(6429), 875-880.
- Schulte, U., Weidemann, S., Ludwig, J., Ruppertsberg, J. und 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(Pt 1), 49-58.
- Schulze, D., Rapedius, M., Krauter, T. und Baukrowitz, T. (2003). Long-chain acyl-CoA esters and phosphatidylinositol phosphates modulate ATP inhibition of KATP channels by the same mechanism. *J Physiol*, 552(Pt 2), 357-367.
- Suzuki, A., Hirata, M., Kamimura, K., Maniwa, R., Yamanaka, T., Mizuno, K., Kishikawa, M., Hirose, H., Amano, Y., Izumi, N., Miwa, Y. und Ohno, S. (2004). aPKC acts upstream of PAR-1b in both the establishment and maintenance of mammalian epithelial polarity. *Curr Biol*, 14(16), 1425-1435.
- Swartz, K. J. (2004). Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nat Rev Neurosci*, 5(12), 905-916.
- Tertyshnikova, S., Knox, R. J., Plym, M. J., Thalody, G., Griffin, C., Neelands, T., Harden, D. G., Signor, L., Weaver, D., Myers, R. A. und Lodge, N. J. (2005). BL-1249 [(5,6,7,8-tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl]-amine]: a putative potassium channel opener with bladder-relaxant properties. *J Pharmacol Exp Ther*, 313(1), 250-259.
- Tóth, A., Blumberg, P. M. und Boczán, J. (2009). Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1). *Vitam Horm*, 81, 389-419.
- Tucker, S. J. und Baukrowitz, T. (2008). How highly charged anionic lipids bind and regulate ion channels. *J Gen Physiol*, 131(5), 431-438.
- Tulleuda, A., Cokic, B., Callejo, G., Saiani, B., Serra, J. und Gasull, X. (2011). TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Mol Pain*, 7, 30.
- 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(8), 2560-2564.

- Veale, E. L., Al-Moubarak, E., Bajaria, N., Omoto, K., Cao, L., Tucker, S. J., Stevens, E. B. und Mathie, A. (2014). Influence of the N terminus on the biophysical properties and pharmacology of TREK1 potassium channels. *Mol Pharmacol*, 85(5), 671-681.
- Watkins, J. L., Lewandowski, K. T., Meek, S. E., Storz, P., Toker, A. und Piwnica-Worms, H. (2008). Phosphorylation of the Par-1 polarity kinase by protein kinase D regulates 14-3-3 binding and membrane association. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(47), 18378-18383.
- Wei, A. D., Gutman, G. A., Aldrich, R., Chandy, K. G., Grissmer, S. und Wulff, H. (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57(4), 463-472.
- Yang, Y., Li, S., Jin, Z. R., Jing, H. B., Zhao, H. Y., Liu, B. H., Liang, Y. J., Liu, L. Y., Cai, J., Wan, Y. und Xing, G. G. (2018). Decreased abundance of TRESK two-pore domain potassium channels in sensory neurons underlies the pain associated with bone metastasis. *Sci Signal*, 11(552).
- Yellen, G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419(6902), 35-42.

8. Danksagung

Viele Personen haben dazu beigetragen, dass diese Doktorarbeit in der vorliegenden Form möglich wurde.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Baukrowitz für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die unermüdliche Betreuung bedanken.

Insbesondere gilt mein Dank Herrn Dr. Marcus Schewe für die Einführung in die Elektrophysiologie, die Diskussionsbereitschaft mit vielen wichtigen Ratschlägen und die hervorragende Betreuung.

Ebenfalls möchte mich bei Dr. Ehsan Nematian, Dr. Marianne Musinszki, Dr. Sönke Cordeiro, Hariolf Fritzenschaft und Michaela Unmack für ihre Unterstützung, Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Frau und meinen Geschwistern für ihre großzügige Unterstützung und das unentwegte Vertrauen bedanken. Ihnen widme ich meine Doktorarbeit.

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen von meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Baukrowitz und meinem Betreuer Dr. Marcus Schewe hinsichtlich der Form und des Inhalts 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, den 31.03.2022