



**Kaliumkanäle der K2P-Familie kontrollieren  
die Aktivität neuronaler Zellen -  
TRESK als Regulator inflammatorischer Hyperalgesie**

**Potassium channels of the K2P-family  
control the activity of neuronal cells -  
TRESK as regulator of inflammatory hyperalgesia**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences, Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Neurowissenschaften,

Research Training Group RTG 1253/2

Processing of affective stimuli: from the molecular basis to the emotional experience

Vorgelegt von

**Sina Kollert**

aus

**Würzburg**

Würzburg 2015

Eingereicht am: .....

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

Vorsitzender: Prof. Dr. Paul Pauli

1. Betreuer: Prof. Dr. Erhard Wischmeyer

2. Betreuer: Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch

3. Betreuer: Prof. Dr. Karl Mertens

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunden ausgehändigt am: .....

„Man klagt so sehr bei jedem Schmerz  
und freut sich so selten,  
wenn man keinen hat.“

Georg Christoph Lichtenberg

– Für meine Familie –

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>I. Zusammenfassung/Abstract .....</b>	<b>7</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>9</b>
<b>II. Einleitung .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Die Familie der Zweiporen-Domänen Kalium-Kanäle .....</b>	<b>12</b>
1.1 Regulation der K <sub>2</sub> P-Kanäle .....	14
1.2 Die physiologische Bedeutung von TRESK-Kanälen .....	16
<b>2. Weitere Ionenkanäle in DRG-Neuronen .....</b>	<b>19</b>
<b>3. Die Entzündungsreaktion .....</b>	<b>20</b>
3.1 Entzündungsmediatoren und ihre Wirkung .....	20
3.2 LPA und ihre Rezeptoren .....	22
<b>4. Zielsetzungen der Arbeit .....</b>	<b>24</b>
<b>III. Material .....</b>	<b>26</b>
<b>1. Biologisches Material .....</b>	<b>26</b>
1.1 Versuchstiere .....	26
1.2 Zelllinien .....	26
<b>2. Molekularbiologisches Material .....</b>	<b>27</b>
2.1 Nukleinsäuren .....	27
2.2 Enzyme .....	29
2.3 Antibiotika .....	30
2.4 Agonisten und Inhibitoren .....	30
<b>3. Sonstige Chemikalien .....</b>	<b>31</b>
<b>4. Medien, Puffer und Lösungen .....</b>	<b>32</b>
<b>5. Messlösungen .....</b>	<b>33</b>
<b>6. Reaktionskits .....</b>	<b>35</b>
<b>7. Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>35</b>
<b>8. Geräte .....</b>	<b>36</b>
<b>9. Computerprogramme .....</b>	<b>37</b>
<b>IV. Methoden .....</b>	<b>38</b>
<b>1. Analyse der Genexpression .....</b>	<b>38</b>
1.1 RNA-Extraktion .....	38
1.2 Reverse Transkription der cDNA .....	38
<b>2. Klonierungen .....</b>	<b>39</b>
2.1 Einbringen der Kanäle und Rezeptoren in geeignete Vektoren .....	39
2.2 Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	40
<b>3. Zielgerichtete Mutagenese .....</b>	<b>41</b>
<b>4. In-vitro Transkription von cRNA .....</b>	<b>41</b>
<b>5. Heterologe Genexpression in Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> .....</b>	<b>42</b>
5.1 Präparation der Oozyten .....	43
5.2 Injektion der cRNA .....	43

5.3	Kultivierung der Oozyten .....	44
<b>6.</b>	<b>Zellkultur und Transfektion .....</b>	<b>44</b>
6.1	F-11 Zellen.....	44
6.2	Primärkultur von DRG-Neuronen.....	45
<b>7.</b>	<b>Elektrophysiologie.....</b>	<b>46</b>
7.1	Zwei-Elektrode-Spannungsklemme der <i>Xenopus</i> Oozyten .....	47
7.2	Elektrophysiologie der F-11 Zellen und primären DRG-Neurone .....	48
<b>8.</b>	<b>Statistische Datenanalyse .....</b>	<b>50</b>
<b>V.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>
<b>1.</b>	<b>Expressionsmuster in DRG-Neuronen .....</b>	<b>52</b>
1.1	Expressionsmuster von Ionenkanälen und Rezeptoren .....	52
1.2	Detektion von TRESK- und TRPV1-Kanalproteinen mit Immuncytochemie.....	53
<b>2.</b>	<b>Aktivierung von TRESK durch Gq-gekoppelte Rezeptoren.....</b>	<b>55</b>
<b>3.</b>	<b>Regulation von TRESK durch LPA-Rezeptoren.....</b>	<b>57</b>
<b>4.</b>	<b>Inhibition von TASK-1 und TREK-1 durch LPA .....</b>	<b>61</b>
<b>5.</b>	<b>Ko-Regulation von TRP- und TRESK-Kanälen durch LPA .....</b>	<b>63</b>
5.1	Einfluss von LPA auf TRPV1 .....	63
5.2	Ko-Expression von TRPV1 und TRESK.....	64
5.3	Einfluss von LPA auf TRPA1 .....	65
5.4	Ko-Expression von TRPA1 und TRESK.....	67
<b>6.</b>	<b>Steuerung der Erregbarkeit von F-11 Zellen durch TRESK-Kanäle.....</b>	<b>68</b>
6.1	Expressionsprofil von K2P-Kanälen in F-11 Zellen .....	68
6.2	Einfluss der heterologen Expression von TRESK in F-11 Zellen .....	69
<b>7.</b>	<b>Regulation der Erregbarkeit in primären DRG-Neuronen durch TRESK-Kanäle.....</b>	<b>71</b>
7.1	Aktivierung des $I_{K_{SO}}$ durch LPA in DRG-Neuronen .....	72
7.2	Zeitgleiche Aktivierung von TRESK- und TRPV1-Kanälen in DRG-Neuronen.....	73
7.3	Erhöhte Erregbarkeit der DRG-Neurone durch LPA.....	74
<b>VI.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>77</b>
<b>1.</b>	<b>Ionenkanäle als Ziel für Analgetika.....</b>	<b>77</b>
1.1	Expression von TRESK, TRP-Kanälen und LPA-Rezeptoren in DRG-Neuronen ..	78
1.2	Regulation von K2P-Kanälen durch G-Proteine .....	79
<b>2.</b>	<b>Einfluss von Entzündungsmediatoren auf K2P-Kanäle.....</b>	<b>80</b>
<b>4.</b>	<b>Regulation der Erregbarkeit in Neuronen .....</b>	<b>83</b>
4.1	Überexpression von TRESK in einer neuronalen Zelllinie.....	84
4.2	Effekte von TRESK auf Trigeminal- und Spinalganglien .....	84
<b>5.</b>	<b>TRESK und Migräne .....</b>	<b>86</b>
<b>6.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>87</b>
<b>VII.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>89</b>
<b>VIII.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>98</b>
Danksagung .....	98	
Publikationsliste .....	100	
Curriculum vitae .....	101	
Affidavit/Eidesstattliche Erklärung .....	103	

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der K2P-Kanäle. ....	13
Abb. 2: Schematische Darstellung der TRESK-Aktivierung durch GPCR. ....	16
Abb. 3: Darstellung der Entzündungsreaktion.....	21
Abb. 4: Signalweg der fünf LPA-Rezeptoren LPA <sub>1</sub> -LPA <sub>5</sub> . ....	23
Abb. 5: Skizze der verwendeten Vektoren. ....	28
Abb. 6: Messprotokolle für Messungen in <i>Xenopus</i> Oozyten. ....	48
Abb. 7: Messprotokolle für F-11 Zellen und DRG-Neurone. ....	50
Abb. 8: Expressionsprofil von Ionenkanälen und GPCR.....	52
Abb. 9: Detektion des TRESK Kanalproteins mit Hilfe eines neu entwickelten Antikörpers. ....	54
Abb. 10: Aktivierung von Gq <sub>11</sub> -gekoppelten Rezeptoren erhöhen den TRESK-Strom. .....	56
Abb. 11: LPA aktiviert TRESK-Kanäle in <i>Xenopus</i> Oozyten.....	58
Abb. 12: Hemmung des TRESK-Stromes durch Lamotrigin. ....	59
Abb. 13: Signalweg der Gαq-gekoppelte Rezeptoren und Calcineurinbindung.....	60
Abb. 14: Einfluss von LPA auf TREK-1 und TASK-1. ....	62
Abb. 15: LPA aktiviert TRPV1-Ströme in <i>Xenopus</i> Oozyten.....	64
Abb. 16: TRPV1 und TRESK werden durch LPA gleichzeitig aktiviert. ....	65
Abb. 17: LPA aktiviert TRPA1-Ströme in <i>Xenopus</i> Oozyten.....	66
Abb. 18: TRPA1 und TRESK werden simultan durch LPA aktiviert.....	67
Abb. 19: Expressionsprofil von K2P-Kanälen in F-11 Zellen. ....	69
Abb. 20: Transfektion von F-11 Zellen mit TRESK verringert die zelluläre Erregbarkeit. ....	70
Abb. 21: LPA-Rezeptoren aktivieren IK <sub>SO</sub> -Ströme in DRG-Neuronen. ....	72
Abb. 22: Gleichzeitige Aktivierung von TRESK- und TRPV1-Strömen durch LPA in DRG-Neuronen. ....	74
Abb. 23: Erhöhte Erregbarkeit in DRG-Neuronen durch LPA.....	75
Abb. 24: Modell des regulierenden Effekts von TRESK während einer Entzündung.83	

## Abkürzungsverzeichnis

	4-AP.....	4-Aminopyridine
	5-HT.....	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
	5-HT <sub>2C</sub> .....	Serotonin-Rezeptor 2C
	$\alpha$ -Met-5-HT.....	$\alpha$ -Methylserotonin
<b>A</b>	AITC.....	Allylthiocyanat, Senföl
	as.....	antisense
	ATP.....	Adenosintriphosphat
<b>B</b>	B <sub>1</sub> .....	Bradykinin-Rezeptor 1
	B <sub>2</sub> .....	Bradykinin-Rezeptor 2
	bp.....	Basenpaar
	BSA.....	bovine serum albumin
<b>C</b>	Ca <sup>2+</sup> .....	Kalzium
	cDNA.....	copy-DNA
	CH <sub>3</sub> KO <sub>3</sub> S.....	Kaliummethansulfonat
	CO <sub>2</sub> .....	Kohlenstoffdioxid
	cRNA.....	copy-RNA
<b>D</b>	DAG.....	Diacylglycerol
	DAPI.....	4',6-Diamidin-2-phenyl
	DEPC.....	Diethylpyrocarbonat
	DMEM.....	Dulbecco`s modified Eagle medium
	DRG.....	dorsal root ganglion, Spinalganglion, Hinterwurzelganglion
<b>E</b>	EC <sub>50</sub> .....	Konzentration, bei der ein halb-maximaler Effekt eintritt
	EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat
	EGTA.....	Ethylenglycoltetraacetat
<b>F</b>	FBS.....	fetal bovine serum
<b>G</b>	GAPDH.....	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
	GFP.....	grün fluoreszierendes Protein
	GPCR.....	G-protein coupled receptor, G-Protein gekoppelter Rezeptor
	GTP.....	Guanosintriphosphat

<b>H</b>	h.....	<i>Homo sapiens</i>
	H <sub>1</sub> .....	Histamin-Rezeptor-1
	HEK.....	human embryonic kidney cells, humane embryonale Nierenzellen
	HERG.....	Human-ether-a-go-go-related-Gen-Kanal
<b>I</b>	IK <sub>SO</sub> .....	standing outward current, K <sup>+</sup> -Hintergrundstrom
	IP <sub>3</sub> .....	Inositoltrisphosphat
	IV.....	Strom-Spannungs-Beziehung
<b>K</b>	K-Zellen.....	kompetente <i>E.coli</i> Bakterienzelle
	K <sup>+</sup> .....	Kalium
	K2P.....	Two-pore-domain K <sup>+</sup> channel, Zweiporen-Domänen Kaliumkanal
	KCl.....	Kaliumchlorid
	ko.....	knockout
<b>L</b>	LB.....	Lysogeny broth
	LPA.....	Lysophosphatidsäure
	LPA <sub>1-1</sub> .....	LPA-Rezeptor 1-1
	LPA <sub>1-2</sub> .....	LPA-Rezeptor 1-2
	LPA <sub>2</sub> .....	LPA-Rezeptor 2
	LPA <sub>3</sub> .....	LPA-Rezeptor 3
<b>M</b>	LPA <sub>4</sub> .....	LPA-Rezeptor 4
	LPA <sub>5</sub> .....	LPA-Rezeptor 5
	m.....	<i>mus musculus</i>
	Maju.....	Many-Jumps-Messprotokoll
	MgCl <sub>2</sub> .....	Magnesiumchlorid
<b>N</b>	MOPS.....	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
	n.....	Anzahl der durchgeführten Messungen
	Na <sup>+</sup> .....	Natrium
	NaCl.....	Natriumchlorid
	NaHCO <sub>3</sub> .....	Natriumhydrogencarbonat
<b>P</b>	Nav.....	spannungsgesteuerten Natriumkanälen
	PBS.....	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
	PEI.....	Polyethylenimin
	PIP <sub>2</sub> .....	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
	PKC.....	Proteinkinase C
	PLC.....	Phospholipase C



<b>R</b>	r..... <i>Rattus norvegicus</i> rpm.....rounds per minutes, Umdrehungen pro Minute RT-PCR.....reverse transcription Polymerasekettenreaktion
<b>S</b>	SEM.....standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwerts ss.....sense
<b>T</b>	TAE.....TRIS-Acetat-EDTA-Puffer TALK.....TWIK-related Alkaline pH-activated K <sup>+</sup> -Kanal TASK-1..... TWIK-related acid-sensitive K <sup>+</sup> -Kanal 1 TASK-2..... TWIK-related acid-sensitive K <sup>+</sup> -Kanal 2 TE.....TRIS-EDTA-Puffer TEA.....Tetraethylammonium TEVC.....two-electrode-voltage-clamp, Zwei-Elektroden-Spannungsklemme TG.....Trigeminalganglion THIK.....Tandem-Pore Domain Halothane-Inhibited K <sup>+</sup> -Kanal TRAAK.....TWIK-related arachidonic acid- stimulated K <sup>+</sup> -Kanal TREK-1.....TWIK-related K <sup>+</sup> -Kanal 1 TREK-2.....TWIK-related K <sup>+</sup> -Kanal 2 TRESK.....TWIK-related spinal cord K <sup>+</sup> -Kanal Tricain.....Ethyl3-aminobenzoate methansulfonate TRP.....Transient-Receptor-Potential-Kanal TRPA1.....TRP-Ankyrin-Repeat-1-Rezeptor TRPM8.....TRP-Melastin-8-Rezeptor TRPV1.....TRP-Vanilloid-1-Rezeptor TWIK..... weak inwardly rectifying K <sup>+</sup> -Kanal
<b>U</b>	U.....Enzymeinheit
<b>W</b>	wt.....wildtyp
<b>X</b>	XLPA..... <i>Xenopus laevis</i> LPA-Rezeptor

# I. Zusammenfassung/Abstract

## Zusammenfassung

Das Empfinden von Schmerz ist für uns überlebenswichtig. Chronischer Schmerz hingegen hat seine physiologische Bedeutung verloren und wird als eigenes Krankheitsbild angesehen. Schmerzempfindung beginnt mit der Nozizeption. Die Zellkörper nozizeptiver Neurone befinden sich in den Spinalganglien (Hinterwurzelganglion, dorsal root ganglion [DRG]) und Trigeminalganglien (TG). In den DRG-Neuronen macht der Zwei-Poren-Kaliumkanal (K2P) TRESK die Hauptkomponente eines Kaliumstromes, des „standing outward currents“  $I_{K_{SO}}$ , aus. Die physiologische Hauptaufgabe der TRESK-Kanäle liegt in der Regulation der zellulären Erregbarkeit nozizeptiver Neurone. Während einer Entzündungsreaktion werden Entzündungsmediatoren wie Histamin, Bradykinin, Serotonin und Lysophosphatidsäure (LPA) ausgeschüttet und können durch die Aktivierung ihrer G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) oder direkte Interaktion mit Ionenkanälen die nozizeptive Erregung beeinflussen. Durch Anwendung von RT-PCR und eines neu entwickelten Antikörpers wurde die Ko-Expression von TRESK-Kanälen zusammen mit Kanälen der Transient-Receptor-Potential-Kationenkanalfamilie (TRP) und LPA-Rezeptoren in DRG-Neuronen nachgewiesen.

Durch rekombinante Ko-Expression von TRESK-Kanälen und LPA<sub>2</sub>-Rezeptoren in *Xenopus* Oozyten konnte durch Zugabe von LPA eine fast 10-fache Aktivierung des basalen K<sup>+</sup>-Stromes erzielt werden. Die Auswertung der Dosis-Wirkungskurve ergab einen EC<sub>50</sub>-Wert von 0,2 µM LPA. Die LPA-induzierte TRESK-Stromaktivierung konnte durch die Verwendung des mutierten Kanals TRESK<sub>[PQAVAD]</sub> oder durch die Zugabe des Phospholipase C (PLC) Inhibitors U73122 verhindert werden. Dies zeigt die Beteiligung des PLC-Signalwegs und die Bindung von Calcineurin an den TRESK-Kanal bei der Stromaktivierung. TRESK ist das einzige Mitglied der K2P-Familie, das eine LPA-induzierte Aktivierung des Stromes zeigt. TREK- und TASK-1-Ströme werden durch LPA inhibiert. In DRG-Neuronen mit kleinem Durchmesser wird Nozizeption durch die Aktivierung von TRPV1-Kanälen durch Hitze oder Capsaicin, dem Inhaltsstoff des Chilis, und zusätzlich durch die Substanz LPA verursacht. Ein weiteres Mitglied der TRP-Familie, der TRPA1-Kanal, ist bei der

verstärkten Nozizeption während einer Entzündung involviert. Werden TRESK- und TRP-Kanäle in *Xenopus* Oozyten ko-exprimiert, verursacht LPA gleichzeitig einen Kationeneinwärts- wie auch -auswärtsstrom. Unter diesen Bedingungen verschob sich das Umkehrpotenzial in einen Bereich zwischen den Umkehrpotenzialen von Oozyten, die nur den  $K^+$ -Kanal exprimieren und von Oozyten, die nur den unspezifischen Kationenkanal exprimieren. Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass die LPA-induzierte Ko-Aktivierung von TRP-Kanälen und TRESK zu einer Begrenzung des exzitatorischen Effekts führen kann.

Die DRG-ähnlichen F11-Zellen exprimieren keine TRESK-Kanäle. Sie sind in der Lage durch Strompulse Aktionspotenziale zu generieren. Mit TRESK transfizierte F11-Zellen zeigten eine Verschiebung des Umkehrpotenzials in negative Richtung, einen größeren Auswärtsstrom und den Verlust von spannungsgesteuerten Natriumkanälen. Auch hohe Strompulse konnten keine Aktionspotenziale mehr auslösen.

Bei Spannungs-Klemme-Messungen von primären DRG-Neuronen von TRESK[wt]-Mäusen erhöhte sich der  $IK_{SO}$  nach Zugabe von LPA um über 20 %. Im Gegensatz dazu zeigten DRG-Neurone von TRESK[ko]-Mäusen unter diesen Bedingungen eine leichte Hemmung des  $IK_{SO}$  von etwa 10 %. In Neuronen, die TRPV1 exprimieren, führte LPA nicht nur zum Anstieg des  $IK_{SO}$ , sondern auch zur Aktivierung eines Einwärtsstromes (TRPV1). Im Vergleich dazu wurde in TRESK[ko]-Neuronen durch LPA nur der Einwärtsstrom aktiviert.

In Strom-Klemme-Experimenten führte LPA-Applikation zur Entstehung von Aktionspotenzialen mit höherer Frequenz in Zellen von TRESK[ko]-Mäusen im Vergleich zu Zellen von TRESK[wt]-Mäusen. Zusätzlich wurde die Erregung, die durch Strompulse von 100 pA ausgelöst wurde, in den beiden Genotypen durch LPA unterschiedlich moduliert. Die Aktionspotenzialfrequenz in TRESK[wt]-Neuronen wurde gesenkt, in TRESK[ko]-Neuronen wurde sie erhöht.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Erregung nozizeptiver Neurone durch LPA aufgrund der Ko-Aktivierung der TRESK-Kanäle abgeschwächt werden kann. Die Erregbarkeit von sensorischen Neuronen wird stark durch die Aktivität und Expression der TRESK-Kanäle kontrolliert. Deswegen sind TRESK-Kanäle gute Kandidaten für die pharmakologische Behandlung von Schmerzkrankheiten.

## Abstract

Pain sensation is essential for survival. Chronic pain lost its physiological function and is categorized as a disease. Pain sensation is initiated by nociception. The cell bodies of nociceptive neurons are located in dorsal root ganglia (DRG) and trigeminal ganglia (TG). In DRG neurons TRESK two-pore-domain potassium channels (K2P) constitute the major current component of the standing outward current  $I_{K_{SO}}$ . A prominent physiological role of TRESK channels has been attributed to the regulation of pain sensation. During inflammation mediators of pain e.g. histamine, bradykinin, serotonin and lysophosphatidic acid (LPA) are released and modulate nociceptive signaling by activation of their G-protein coupled receptors (GPCR) or ionic channels. By means of RT-PCR and a newly developed antibody the co-expression of TRESK channels, channels of the transient-receptor-potential (TRP) cation channel family and LPA receptors in DRG neurons were demonstrated.

Recombinant co-expression of TRESK channels and LPA<sub>2</sub> receptors in *Xenopus* oocytes revealed an almost 10 fold activation of basal K<sup>+</sup> currents upon LPA application with an EC<sub>50</sub> of 0.2 μM LPA. Using mutant TRESK<sub>[PQAVAD]</sub> or application of the phospholipase C (PLC) inhibitor U73122 blocked current augmentation by LPA indicating cellular signaling via PLC pathway and calcineurin binding to TRESK channels. TRESK was the only member of the K2P family that showed a LPA induced activation of current. TREK- und TASK-1 currents were inhibited through LPA. In small diameter DRG neurons nociception results from TRPV1 channel activation by painful stimuli including the inflammatory substance LPA or activation of TRPA1 channels during inflammation. When TRESK and TRP channels are co-expressed in *Xenopus* oocytes cationic inward and outward currents were simultaneously activated by LPA. Under these conditions the reversal potential of ramp recordings was intermediate to recordings from oocytes expressing only the K<sup>+</sup> or the unspecific cation channel. Principally this finding demonstrates that TRESK activation by an inflammatory substance dampens noxious excitation induced by the same agent.

DRG-like F11 cells lacking endogenous TRESK channels generate action potential upon current stimulation. However when TRESK channels were recombinantly expressed in F11 cells, they exhibit a shift of the reversal potential to more negative

values, a larger outward current and a loss of voltage-gated sodium currents. Accordingly, depolarizing pulses failed to elicit action potentials.

In patch-clamp recordings from primary cultured DRG neurons of TRESK[wt] mice  $I_{K_{SO}}$  currents increased after application of LPA by over 20 % whereas under these conditions  $I_{K_{SO}}$  currents of neurons from TRESK[ko] mice decreased moderately by about 10 %. In TRPV1 positive neurons LPA application induced in TRESK[wt] neurons not only an activation of the  $I_{K_{SO}}$  but also an increase of the inward (TRPV1) current. In contrast, in TRESK[ko] neurons LPA only activated an inward (TRPV1) current.

Under current-clamp conditions LPA application elicited spike trains in DRG neurons, with higher frequency in cells of TRESK[ko] mice than in cells of TRESK[wt] animals. In addition, upon depolarizing pulses (100 pA) excitability was differentially modulated by LPA in these genotypes. Spike frequency was attenuated in TRESK[wt] neurons and augmented in TRESK[ko] neurons.

Accordingly, excitation of nociceptive neurons by LPA is balanced by co-activation of TRESK channels. It is evident that the output of sensory neurons is strongly controlled by the activity and the expression of TRESK channels, which therefore are good candidates for the pharmacological treatment of pain disorders.

## II. Einleitung

Schmerz ist als Warn- und Leitsignal für den Menschen überlebenswichtig. Individuen, denen Schmerzsensitivität fehlt, erleiden regelmäßig schwere Verletzungen. Die Weltorganisation *International Association for the Study of Pain* definiert Schmerz als „ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“. Schmerz motiviert den Betroffenen sich aus einer schädlichen Situation zurückzuziehen, einen geschädigten Körperteil während der Heilung zu schonen und ähnliche Situationen in Zukunft zu vermeiden. Beim sogenannten akuten Schmerz geht dem Schmerzempfinden in der Regel ein Reiz voraus und der Schmerz ist zeitlich und lokal begrenzt. Bleibt der Schmerz jedoch über einen längeren Zeitraum bestehen und kann nicht mehr mit einem bestimmten Auslöser in Verbindung gebracht werden, wird er als chronischer Schmerz bezeichnet und wird heute als eigenständiges Krankheitsbild gesehen und behandelt (z.B. Migräne). Chronischer Schmerz kann ebenfalls die Folge einer Gewebeverletzung sein, wie etwa bei chronischen Erkrankungen und Entzündungen (z.B. Rheuma, Krebs).

Die jährlichen volkswirtschaftlichen Kosten, die durch Schmerzzustände entstehen, sind enorm. Hierzu zählen medizinische Behandlungen, Produktivitätseinbußen und Ausgleichszahlungen für Arbeitsunfähigkeit. In den entwickelten Ländern und Industriestaaten belaufen sich die Kosten auf ca. eine Billionen US-Dollar (Stewart et al., 2003; Max and Stewart, 2008). Die Schmerzbekämpfung durch Entwicklung von effizienten und gut verträglichen Schmerzmitteln ist auch volkswirtschaftlich gesehen von großer Bedeutung.

Als Nozizeption bezeichnet man die Aufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung von Schmerzreizen im Nervensystem. Perzeption ist dann die ins Bewusstsein gerückte Wahrnehmung von Sinnesreizen. Die bewusst wahrgenommene Nozizeption ist das, was man eigentlich als Schmerz versteht.

Nozizeptoren sind freie Nervenendigungen der Klasse C und A $\delta$  (schnelle A $\delta$ - und etwas langsamere C-Fasern), deren Zellkörper in den Spinalganglien (Hinterwurzelganglien, dorsal root ganglions [DRG]) liegen, die direkt ins Rückenmark und somit ins zentrale Nervensystem projizieren. Nozizeptoren reagieren auf thermische (Hitze,

Kälte), mechanische (Dehnung, Druck, Durchtrennung) und chemische Reize (pH, endogene Signalstoffe). Endogene Signalmoleküle können als Schmerzmediatoren fungieren und beeinflussen so die Schmerzempfindung im Gehirn.

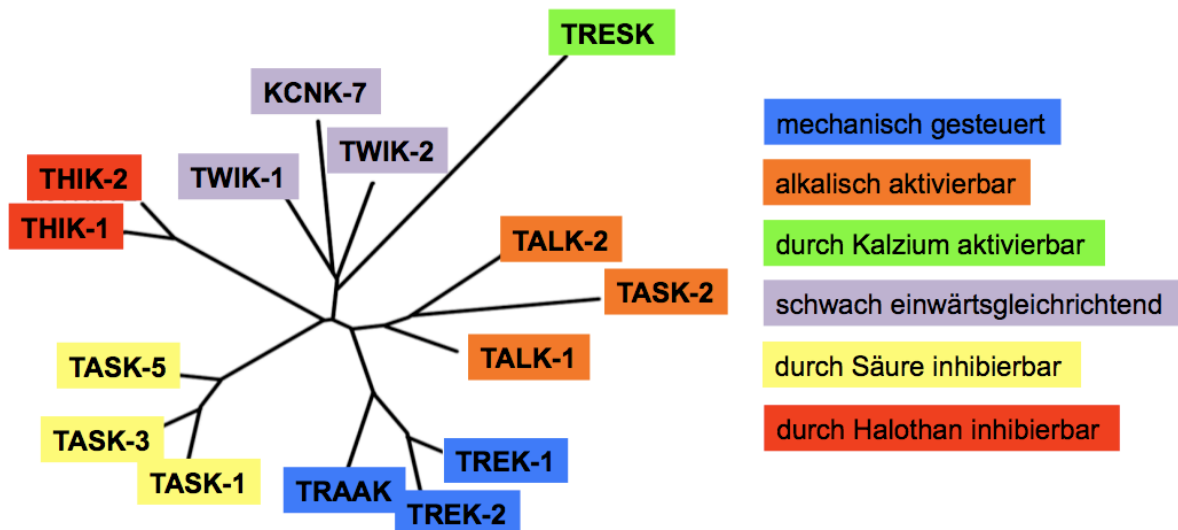
Da Nozizeption und als Folge davon Schmerz mit der Erregbarkeit von Schmerzfasern einhergeht, spielen Ionenkanäle, die in der Membran der A $\delta$ - und C-Fasern zu finden sind, eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Schmerzsignalen. Ionenkanäle, die bei der Nozizeption beteiligt sind, waren schon immer potenzielle Angriffspunkte für Schmerzmedikamente. Eine Ionenkanalfamilie, die besonders wichtig für die Erregbarkeit von neuronalen Zellen ist, wird im folgenden Abschnitt vorgestellt.

## 1. Die Familie der Zweiporen-Domänen Kalium-Kanäle

Im Jahr 1995 wurde zum ersten mal ein Beispiel eines Zweiporen-Domänen Kalium (K<sup>+</sup>)-Kanals (K2P) beschrieben. TOK1 (oder YORK1) stammt aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, besitzt neben den zwei Porendomänen acht Transmembrandomänen (2P/8T) und ist das erste Beispiel eines spannungsunabhängigen auswärts Gleichrichters (Ketchum et al., 1995; Zhou et al., 1995). Im folgendem Jahr wurde ein weiterer K2P-Kanal, ORK1 oder KCNK0, aus dem neuromuskulären Gewebe der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* kloniert, der ebenfalls die namensgebenden zwei Porendomänen, aber nur vier Transmembrandomänen besitzt (2P/4T) (Goldstein et al., 1996). Der erste Säuger-K2P-Kanal, KCNK1 oder TWIK-1, wurde im selben Jahr entdeckt. Dieser besitzt ebenfalls zwei Poren- und vier Transmembrandomänen (2P/4T) (Yellen et al., 1991; Lesage et al., 1996). Seitdem wurden 14 weitere K2P-Kanäle in Säugern identifiziert.

Die Superfamilie der Säuger-K2P-Kanäle besteht aus 15 Mitgliedern, die von den KCNK-Genen (*KCNK1-18*) kodiert werden. Die Superfamilie wird aufgrund der Sequenzverwandtschaft in sechs Unterfamilien eingeteilt, deren Mitglieder in funktionellen und/oder namensgebenden Merkmalen übereinstimmen (Abb. 1; Honoré, 2007): THIK (Tandem-pore domain Halothane-Inhibited K<sup>+</sup>-Kanal), TASK (TWIK-related Acid-Sensitive K<sup>+</sup>-Kanal), TWIK (Weak Inwardly rectifying K<sup>+</sup>-Kanal), TREK/TRAAK (TWIK-RElated K<sup>+</sup>-Kanal/ TWIK-Related Arachidonic Acid-stimulated

K<sup>+</sup>-Kanal), TALK (TWIK-related ALkaline pH-activated K<sup>+</sup>-Kanal) und TRESK (TWIK-RElated Spinal cord K<sup>+</sup>-Kanal).



**Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der K<sup>2</sup>P-Kanäle.**

Die sechs strukturell und funktionell unterschiedlichen Untergruppen sind durch die verschiedenen Farben markiert. Die farblich markierte Legende beschreibt das wesentliche funktionelle Merkmal der Kanäle.

Die meisten Vertreter der Untergruppen verhalten sich wie K<sup>+</sup>-selektive Leckkanäle, d.h. sie sind selektiv für K<sup>+</sup>-Ionen, ihr Umkehrpotenzial entspricht dem errechneten Nernst-Potenzial für Kaliumströme (ca. -92 mV) und die Ionenströme sind sowohl zeit- als auch spannungsunabhängig (Lotshaw, 2007). Das Verhalten der Strom-Spannungsbeziehung (IV) bei unterschiedlichen K<sup>+</sup>-Konzentrationen lässt sich mit der Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung beschreiben (Goldman, 1943; Hodgkin and Katz, 1949). Aufgrund dieser Eigenschaften sind diese K<sup>+</sup>-Kanäle für einen Hintergrund- oder Leckstrom von Zellen verantwortlich, der das Ruhemembranpotenzial stabilisiert und durch die Veränderung seiner Amplitude die Erregbarkeit von Zellen beeinflussen kann.

Die Aktivität der K<sup>2</sup>P-Kanäle kann vielfältig durch verschiedene physikalische und chemische Komponenten beeinflusst werden, z.B. durch Temperatur (Maingret et al., 2000), Membrandehnung (Maingret et al., 1999a), Protonen (Duprat et al., 1997;



Rajan et al., 2000), freie Fettsäuren, Phospholipide (Fink et al., 1998; Rajan et al., 2001) und sowohl durch lokale als auch volatile Anästhetika (Patel et al., 1998; Sirois et al., 2000; Franks and Honore, 2004).

Die Expression der K2P-Kanäle erstreckt sich auf viele verschiedenen Regionen des zentralen und peripheren Nervensystems, aber auch auf viele nicht neuronale Gewebe wie Herz, Bauchspeicheldrüse, Lunge, Leber und Niere (Lesage and Lazdunski, 2000). Das starke und verbreitete Vorkommen der K2P-Kanäle im zentralen und peripheren Nervensystem deutet auf eine wichtige Rolle bei der neuronalen Erregbarkeit und sensorischen Prozessen hin.

### **1.1 Regulation der K2P-Kanäle**

Auch wenn viele Mitglieder der K2P-Familie wie oben beschrieben das Verhalten eines idealisierten Leckstromes zeigen, bieten die meisten K2P-Kanäle ein weitaus größeres Repertoire ihrer Regulation an.

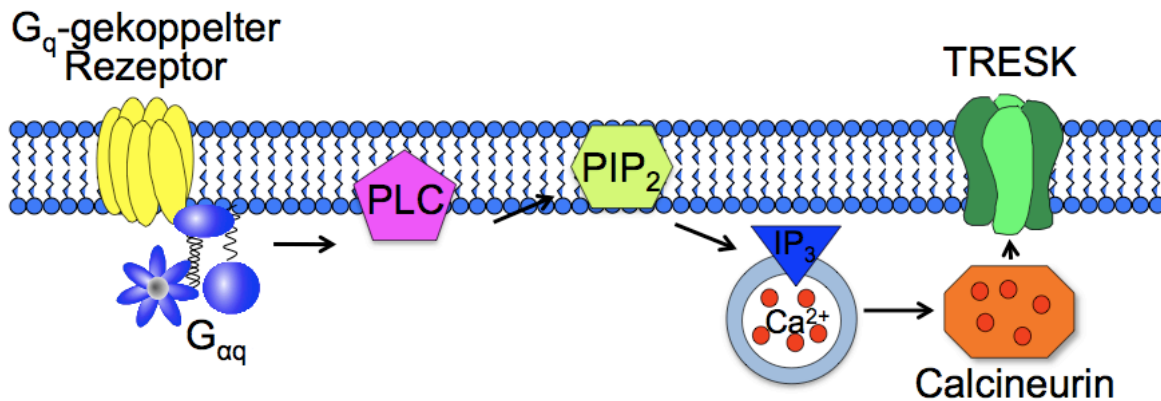
Ionenströme durch die schwachen Einwärtsgerichteter TWIK-1 und TWIK-2 können durch die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) erhöht und durch Erniedrigung des intrazellulären pH-Wertes gehemmt werden (Lesage et al., 1996; Chavez et al., 1999). Beide Kanäle sind nicht sensitiv gegenüber den klassischen  $K^+$ -Kanalblockern Tetraethylammonium (TEA), 4-Aminopyridine (4-AP) oder Cäsium. TWIK-1 kann jedoch im Gegensatz zu TWIK-2 durch Barium, Quinine und Quinidine geblockt werden (Lesage et al., 1997).

TREK-1 und TRAAK waren die ersten Kanäle, die sowohl sensitiv gegenüber Dehnung als auch gegenüber nichtgesättigten Fettsäuren sind (Fink et al., 1998; Maingret et al., 1999b; Patel et al., 1998; Lesage et al., 2000). Beide Kanäle können durch die neuroprotektive Substanz Riluzol aktiviert werden (Duprat et al., 2000).

TASK-1- und TASK-2-Kanäle sind sensitiv gegenüber extrazellulärer pH-Veränderungen in einem engen Bereich der sehr nahe am physiologischen pH-Wert liegt (Duprat et al., 1997). Auch verschiedene lokale Anästhetika können TASK-Kanäle beeinflussen. So werden sie durch Lidocaine und Bupivacaine gehemmt (Reyes et al., 1998). TASK-1 kann jedoch durch volatile Anästhetika wie Halothan und Isofluran auch aktiviert werden (Patel et al., 1999).

Zusätzlich können K2P-Kanäle auch durch Neurotransmitter über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) reguliert werden (Mathie, 2007). So wurde gezeigt, dass Motoneurone im Hirnstamm von Ratten durch den Neurotransmitter Serotonin (5-HT) reguliert werden können. Dies führt zur Hemmung von TASK-Strömen, höchstwahrscheinlich durch die Aktivierung der  $\alpha$ -Untereinheit von  $G\alpha q$ -gekoppelten Rezeptoren (Sirois et al., 2002; Chen et al., 2006).

Der TRESK-Kanal bildet eine eigene Untergruppe der K2P-Kanäle. Der humane TRESK-Kanal wurde zuerst aus dem Rückenmark kloniert und danach benannt (Sano et al., 2003). Er besitzt nur 19 % Aminosäureidentität mit den anderen K2P-Kanälen (Sano et al., 2003) und ist der einzige K2P-Kanal, der durch die Änderung von intrazellulärem Kalzium ( $Ca^{2+}$ ) reguliert werden kann (Czirjak et al., 2004). TRESK-Kanäle sind ganz leicht auswärtsgerichtet, spannungsunabhängig, werden nicht durch die klassischen  $K^+$ -Kanalblocker TEA und 4-AP gehemmt, können aber durch  $Ba^{2+}$  und Quinidine teilweise inhibiert werden (Sano et al., 2003; Kang et al., 2004). Agonisten für den  $G\alpha q$ -Protein gekoppelte Rezeptor können TRESK-Ströme um ein Vielfaches erhöhen. So steigert sich der TRESK-Strom durch die Aktivierung des M1 cholinergen Rezeptors um das Fünffache (Enyedi et al., 2012). Entscheidend bei der Aktivierung des TRESK-Kanals ist die Bindung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin, die direkt an die Aminosäuresequenz PQIVID in einer intrazellulären Schleife des Kanals bindet (Abb. 13; Czirjak et al., 2004; Czirjak and Enyedi, 2006). Der intrazelluläre Signalweg der über  $G\alpha q$ -gekoppelte Rezeptoren zur Aktivierung von TRESK-Kanälen führt ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Bindet ein  $Gq$ -gekoppelter Rezeptor seinen Agonisten, führt die Abspaltung der  $G\alpha$ -Untereinheit zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Diese wiederum spaltet Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ).  $IP_3$  führt dazu, dass intrazelluläres  $Ca^{2+}$  freigesetzt wird, das die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Calcineurin bindet direkt an den TRESK-Kanal und aktiviert ihn durch Dephosphorylierung angrenzender Aminosäuren.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der TRESK-Aktivierung durch GPCR.**

Wird der Gq-gekoppelte Rezeptor aktiviert, führt die Abspaltung der G $\alpha$ -Untereinheit zur Aktivierung der PLC, diese wiederum setzt aus PIP<sub>2</sub> IP<sub>3</sub> frei. IP<sub>3</sub> führt zur Kalziumfreisetzung, was die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Calcineurin bindet an den Kanal und der TRESK-Kanal wird durch Dephosphorylierung aktiviert.

Im folgenden Abschnitt wird auf die Besonderheiten und die physiologische Bedeutung des TRESK-Kanals noch detaillierter eingegangen.

## 1.2 Die physiologische Bedeutung von TRESK-Kanälen

Die mit Abstand stärkste Expression zeigt TRESK in den DRG und in anderen sensorischen Ganglien wie den Trigeminalganglien (TG) (Kang and Kim, 2006; Dobler et al., 2007; Yoo et al., 2009; Lafreniere et al., 2010; Tulleuda et al., 2011). Innerhalb der Zellpopulation der DRG-Neurone findet man TRESK in sensorischen Neuronen mit kleinem, mittlerem und großem Durchmesser (Kang and Kim, 2006). Insgesamt konnte TRESK in über 90 % der DRG-Neurone nachgewiesen werden (Dobler et al., 2007). Neben der DRG- und TG-Neurone konnte TRESK-mRNA auch in Regionen des zentrale Nervensystems von Menschen und Mäusen nachgewiesen werden (Sano et al., 2003; Czirjak et al., 2004; Kang et al., 2004; Liu et al., 2004; Keshavaprasad et al., 2005; Dobler et al., 2007). In den DRG-Neuronen werden neben dem TRESK-Kanal auch noch andere K<sup>2</sup>P-Kanäle exprimiert, wie z.B. TREK-1 und 2 sowie auf einem etwas niedrigerem Niveau TRAAK und TASK-Kanäle (Kang and Kim, 2006; Cooper et al., 2004; Medhurst et al., 2001).

In DRG- und TG-Neuronen beläuft sich der relative Beitrag von TRESK zum gesamten K<sup>+</sup>-Hintergrundstrom, den sogenannten "standing outward current" oder

kurz  $IK_{SO}$ , auf ca. 20 % und macht somit die größte Einzelkomponente des  $IK_{SO}$  aus (Dobler et al., 2007; Lafreniere et al., 2010).

Die TRESK[G339R]-Mauslinie ist eine funktionelle TRESK knockout (ko) Mauslinie, bei der durch einen Basenaustausch ein Glycin durch ein Arginin ersetzt wurde. Dieser Aminosäureaustausch führt zu einem funktionellen Ausfall des Proteins. TRESK[ko]-Mäuse sind lebensfähig und haben einen unauffälligen Phänotyp (Dobler et al., 2007; Chae et al., 2010; Tulleuda et al., 2011). Der  $IK_{SO}$  in DRG-Neuronen von TRESK[ko]-Mäuse ist um 27 % reduziert im Vergleich zu wildtypischen (wt) Mäusen (Dobler et al., 2007). Zellen von TRESK[ko]-Mäuse zeigen auch eine höhere Sensitivität gegenüber depolarisierender Pulse (Dobler et al., 2007).

Eine große Rolle spielt TRESK bei der Modulation der Nozizeption. TRESK-Kanäle sind sehr sensitiv gegenüber volatilen Anästhetika in schon sehr geringen Konzentrationen (Liu et al., 2004; Keshavaprasad et al., 2005). TRESK[ko]-Tieren sind weniger sensitive gegenüber Isofluran in kleinsten Konzentrationen, die in wildtypischen Tieren 50 % der Bewegung beim „Tail-Clamp“-Test unterdrücken (Chae et al., 2010). Das Antiepileptikum Lamotrigin, das in der Medizin als Medikament gegen Krampfanfälle, bipolare Störungen und neuropathischen Schmerz eingesetzt wird, kann TRESK-Ströme in DRG-Neuronen reduzieren (Kang et al., 2008). In mit mTRESK transfizierten COS-7-Zellen konnte der TRESK-Strom mit 30  $\mu$ M Lamotrigin um 50 % inhibiert werden (Kang et al., 2008). Auf andere K2P-Kanäle wie TREK-2 hatte Lamotrigin keinen Einfluss (Kang et al., 2008). Das spricht dafür, dass Lamotrigin spezifisch TRESK-Ströme inhibieren kann. Ein weiteres Beispiel für den Einfluss von TRESK auf die Nozizeption ist, dass TRESK[ko]-Mäuse bei einem Test für Hitzeschmerz stärker auf Hitzereize reagierten als die wildtypischen Mäuse (Chae et al., 2010). Auch die Herunterregulierung der TRESK-Expression durch siRNA erhöht die Sensitivität gegenüber schmerzhaften Reizen (Tulleuda et al., 2011). Die Überexpression von TRESK in DRG-Neuronen hingegen vermindert die durch Verletzung ausgelöste mechanische Allodynie (Zhou et al., 2013).

Die aktive Komponente im Szechuan-Pfeffer, hydroxy-alpha-Sanshool, kann komplexe physiologische Empfindungen hervorrufen, die am besten als prickelnde oder kribbelnde Parästhesie beschrieben werden können. Dieser Effekt von

Sanshool wird durch die Inhibition der K2P-Kanäle TRESK, TASK-1 und 3 verursacht (Bautista et al., 2008).

Eine dominant-negative Mutation im humanen TRESK-Kanal ist mit einer erblichen Form von Migräne mit Aura assoziiert (Lafrenière et al., 2010). In 16 Familienmitgliedern wurde das *KCNK18*-Gen, das für den TRESK-Kanal kodiert, sequenziert. Die acht Mitglieder, die die Mutation im TRESK-Kanal aufwiesen, litten auch alle an typischen Migränekopfschmerzen. Die anderen acht Familienmitglieder ohne Migräne hatten ein normales TRESK-Gen (Lafrenière et al., 2010). Die Mutation führt zu einer verkürzten Kanaluntereinheit, die keine vollständigen Kanäle bilden kann und einen dominant-negativen Effekt auf wildtypische Kanaluntereinheiten hat (Liu et al., 2013). In eine Review beschreiben Lafrenière und Rouleau (Lafrenière and Rouleau, 2011) eine weitere Mutation im TRESK-Kanal bei einem Patienten, der ebenfalls an Migräne leidet

Migräne ist eine neurologische Erkrankung und betrifft 10-15 % aller Erwachsenen. Neben den erblichen Formen der Migräne gibt es über den komplexen Pathomechanismus von Migräne verschiedene Hypothesen, die vermutlich alle zusammen wirken. Die vaskuläre Hypothese beschreibt die erweiterten Blutgefäße des Kopfes, die während eines Migräneanfalls beobachtet werden (Moskowitz and Macfarlane, 1993). Die Dehnung der Blutgefäße führt zur Aktivierung von Dehnungs- und Chemorezeptoren des Nervus trigeminus (trigeminovaskulärer Effekt; May and Goadsby, 1999). Bei der Übererregbarkeits-Hypothese der Migräne zeigen die Patienten eine erhöhte Erregbarkeit im occipitalen Cortex. Diese beobachtete Depolarisation kommt durch die Freisetzung von Kationen in den Extrazellulärraum zustande. Eine weitere Hypothese zum Pathomechanismus der Migräne ist die neurogene Entzündung. Während eines Migräneanfalls kommt es zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren, die wiederum eine Entzündungsreaktion in Gang setzen (Moskowitz, 1993).

Entzündungsreaktionen gehen fast immer mit Nozizeption und Schmerzempfinden einher. Auf den Aspekt der Nozizeption bei Entzündungsreaktionen und daran beteiligte Proteine wird im Punkt II.3 noch genauer eingegangen.

## 2. Weitere Ionenkanäle in DRG-Neuronen

In den schmerzleitenden C-Fasern der DRG-Neurone machen spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Nav) einen großen Anteil der Ströme aus, die für die Depolarisation nach einer Stimulation und für die Weiterleitung der Aktionspotenziale verantwortlich sind. Diese Nav-Kanäle sind ebenfalls von großer Bedeutung bei der Entstehung von Schmerzsignalen. Das zeigen loss-of-function Mutationen im Nav1.7 Natriumkanal, die eine totale Insensibilität gegenüber Schmerzen verursachen (Cox et al., 2006). Null-Mutationen von Nav1.7 führen zu dem Verlust großer sensorischer Fasern und damit ebenfalls zur Unfähigkeit Schmerzen zu empfinden (Yuan et al., 2013). Die Mutation anderer Nav-Kanäle kann ebenfalls zum Verlust des Schmerzempfindens führen wie Leipold und Kollegen in ihrer Studie über den Nav1.9-Kanal zeigten (Leipold et al., 2013).

Mitglieder der nicht-selektiven TRP-Kanäle (TRP = Transient Receptor Potential) sind ebenfalls stark in DRG-Neuronen exprimiert. Capsaicin aus der Chili-Pflanze, Menthol aus der Minze und Senföl (Allylisothiocyanat, AITC) stimulieren die nicht-selektiven Kationenkanäle vom Typ TRPV1, TRPM8 sowie TRPA1 und verursachen Empfindungen wie Brennen, Kühle bis hin zu akutem Schmerz (zusammengefasst in Gerhold and Bautista, 2009). TRPV1-Kanäle sind in den kleinen, schmerzleitenden C-Fasern der DRG-Neurone exprimiert und können neben Temperaturen über 45°C auch durch chemische Substanzen und saures Milieu, wie es bei einer Entzündung auftritt, aktiviert werden (Caterina et al., 1997). Der TRPA1-Kanal spielt bei Entzündung eine entscheidende Rolle, sowohl als Detektor als auch als Initiator für Entzündungsreaktionen (Bautista et al., 2012). Neben Schmerz (McNamara et al., 2007) ist TRPA1 auch als Sensor für Reizmittel (Brone et al., 2008), Kälte (Karashima et al., 2009) und Dehnung (Garcia-Anoveros and Nagata, 2007) bekannt und wird zusammen mit TRPV1 in Schmerzfasern vom C-Typ exprimiert.

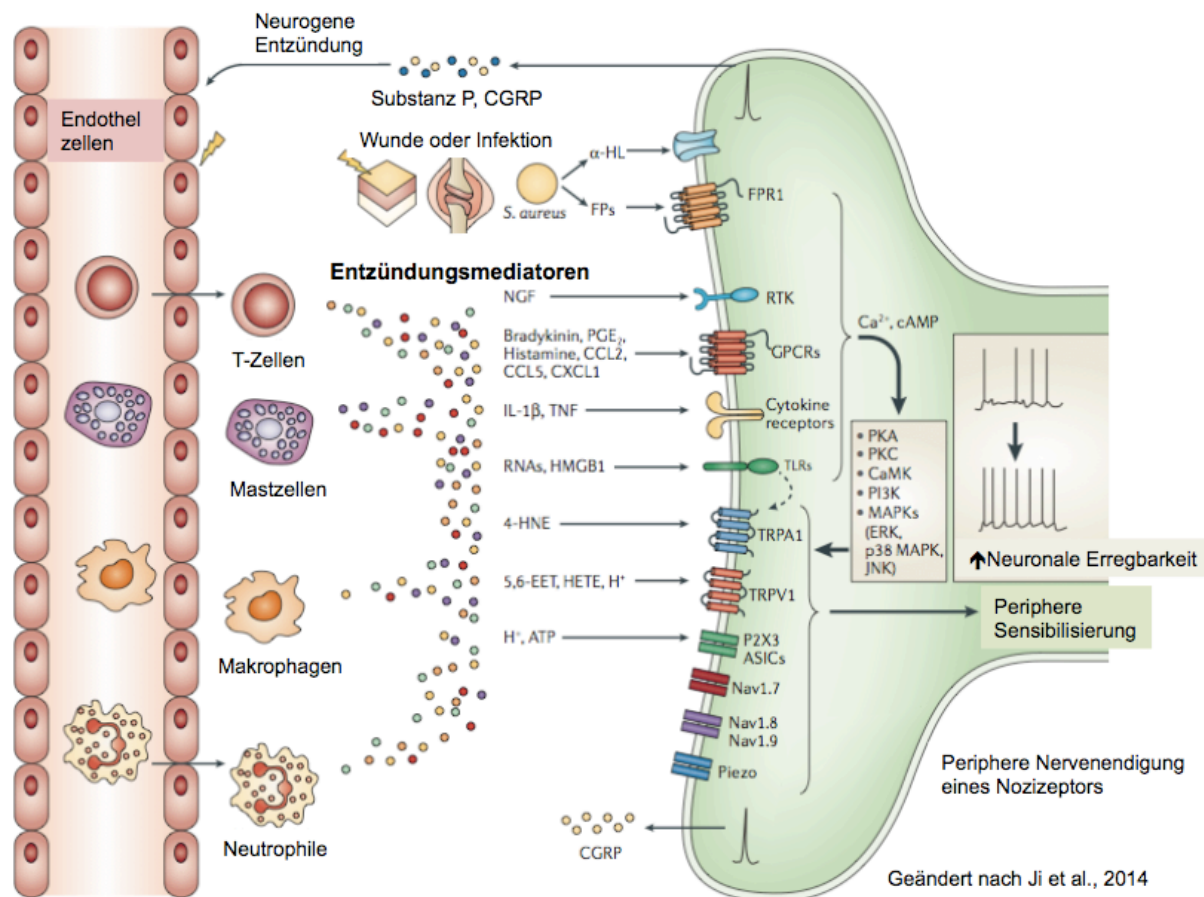
Die Aktivierung von sowohl Nav-Kanälen als auch TRP-Rezeptoren hat eine Depolarisation des Neurons zu Folge, die zu neuronalen Erregung führt und letztendlich Schmerzempfinden verursachen kann.

### 3. Die Entzündungsreaktion

#### 3.1 Entzündungsmediatoren und ihre Wirkung

Entzündung ist eine protektive immunvaskuläre Reaktion des Körpers, bei der Immunzellen, Blutgefäße und viele verschiedene molekulare Mediatoren beteiligt sind. Schmerz und Übererregbarkeit des betroffenen Gewebes sind zwei Kardinaleigenschaften der Entzündung, die durch Entzündungsmediatoren und periphere Sensibilisierung verursacht werden (Abb. 3; zusammengefasst in Ji et al., 2014). Wunden oder Infektionen rufen durch Plasmaeinstrom und Infiltration von Immunzellen wie Makrophagen, T-Zellen und Neutrophilen in das geschädigte Gewebe die Entzündung hervor. Sowohl die infiltrierten Immunzellen als auch schon anwesende Zellen wie Mastzellen, Makrophagen und Keratinozyten schütten eine ganze Reihe von Entzündungsmediatoren aus z.B. Neurotransmitter (z.B. Serotonin oder Histamin), Peptide (z.B. Bradykinin), Lipide, Neutrophine, Cytokine und Chemokine (Basbaum et al., 2009). Nozizeptive Fasern exprimieren an ihren Nervenendigungen eine Vielzahl an Rezeptoren und Ionenkanäle, die für all diese Entzündungsmediatoren empfindlich sind. Die Aktivierung dieser Rezeptoren und Ionenkanäle führt zur Generierung intrazellulärer Botenstoffe wie  $Ca^{2+}$  und cAMP, die ihrerseits eine ganze Reihe von Kinasen aktivieren. Diese Kinasen zusammen mit der direkten Aktivierung von Ionenkanälen durch die Entzündungsmediatoren führen zu Hypersensitivität und vermehrter Erregbarkeit der Nozizeptoren und wird als periphere Sensibilisierung bezeichnet (zusammenfassend dargestellt in Abb.3; Julius and Basbaum, 2001; Basbaum et al., 2009; Ji et al., 2014).

Die Zellkörper der Nozizeptoren sowie die anderer sensibler afferenter Nervenzellen liegen in den DRG. Die Axone der DRG leiten die Informationen über die Hinterwurzel in das Rückenmark und von dort aus gelangen die Signale dann zum Gehirn.



### Abb. 3: Darstellung der Entzündungsreaktion.

Durch Wunden oder Infektionen kommt es zum Plasmaeinstrom und Infiltration von Immunzellen (z.B. Makrophagen, T-Zellen und Neutrophile) in das geschädigte Gewebe. Sowohl die Immunzellen als auch schon anwesende Zellen (z.B. Mastzellen, Makrophagen und Keratinozyten) entlassen eine Reihe von Entzündungsmediatoren (z.B. NGF, Bradykinin, Histamin, TNF, RNA, ATP, H<sup>+</sup>, u.v.m.). In den Nozizeptoren exprimierte Rezeptoren (z.B. GPCR, Cytokin-Rezeptoren) und Ionenkanäle (z.B. TRPV1/A1, Nav1.8/1.9) werden durch diese aktiviert, das wiederum zu Hypersensitivität und zum Anstieg der neuronalen Erregbarkeit führt und als periphere Sensibilisierung bezeichnet wird. Geändert nach Ji et al., 2014.

Neben den klassischen Entzündungsmediatoren, wie sie in Abbildung 3 aufgelistet sind, kommen während einer Entzündung auch eine Reihe anderer Substanzen im betroffenen Gewebe vor. Erst vor Kurzem wurde beschrieben, dass sich die Lysophosphatidsäure (LPA) direkt am Entzündungsort anhäuft und eine bedeutende Rolle bei Entzündungserkrankungen spielt (Sevastou et al., 2012). Diese Funktion von LPA bei der Entstehung von Entzündung und Schmerz wird im Folgenden genauer beschrieben.



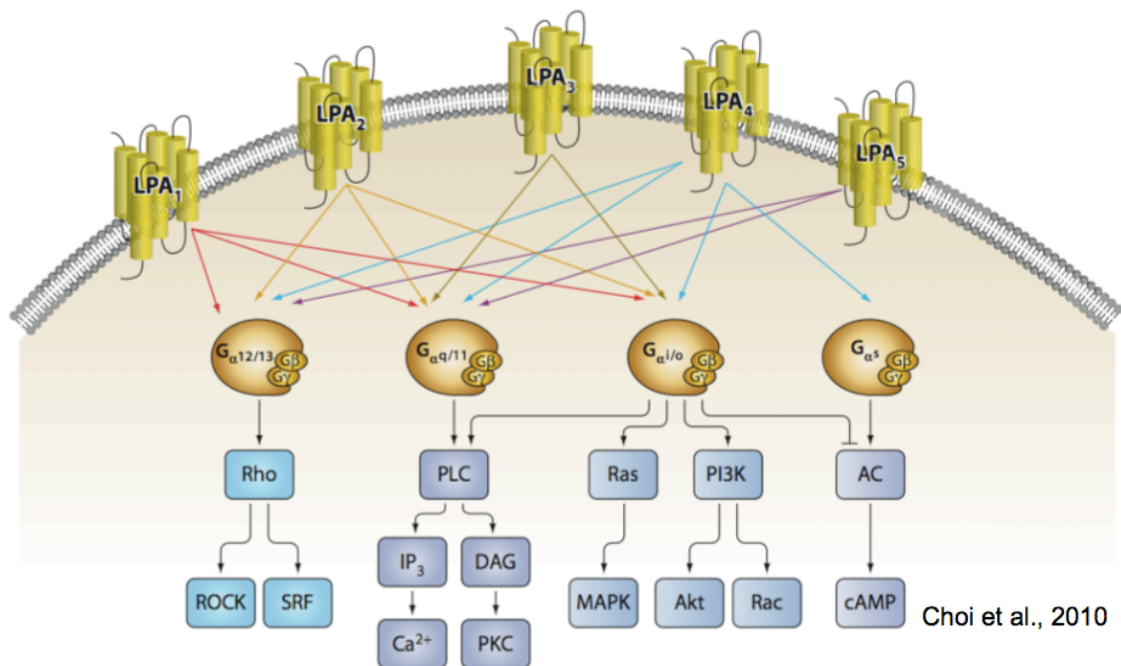
### 3.2 LPA und ihre Rezeptoren

LPA ist ein kleines, bioaktives Phospholipid mit diversen biologischen Funktionen in vielen verschiedenen Zelltypen. Es kommt im Serum, Plasma, anderen biologischen Flüssigkeiten sowie in vielen Geweben inklusive dem Gehirn vor (Tokumura, 2004). LPA entsteht durch die Katalyse verschiedener Enzyme wie Phospholipase A, Monoacylglycerolkinase, Glycerol-3-phosphat Acyltransferase und Autotaxin (Knowlden and Georas, 2014).

LPA vermittelt ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren, die in der Plasmamembran exprimiert werden. Bisher sind fünf GPCR identifiziert ( $LPA_1$ - $LPA_5$ ), die LPA binden (Abb. 4; Noguchi et al., 2009). Studien mit ko-Mäusen für verschiedene LPA-Rezeptoren zeigen eine Reihe physiologischer und pathophysiologischer Eigenschaften von LPA, z.B. in der Gehirnentwicklung (Contos et al., 2000; Contos et al., 2002; Estivill-Torrus et al., 2008; Matas-Rico et al., 2008; Choi et al., 2010), bei neuropathischem Schmerz (Inoue et al., 2004), in neurologischen Erkrankungen wie Schizophrenie (Choi et al., 2010) und bei der Reproduktion von beiden Geschlechtern (Ye et al., 2005; Ye et al., 2008).

Erst kürzlich wurde beschrieben, dass sich LPA im Bereich von Entzündungen ansammelt und eine Rolle bei entzündlichen Erkrankungen wie z.B. Arthritis, multiple Sklerose, pulmonale Fibrose und Hepatitis spielt (Sevastou et al., 2012). Nach einer Nervenverletzung wird LPA ausgeschüttet, aktiviert als extrazelluläres Molekül seine fünf GPCR ( $LPA_1$ - $LPA_5$ ; Abb. 4; Noguchi et al., 2009) und leitet so die Entstehung von neuropathischen Schmerz ein (Ueda, 2006).

Alle fünf LPA-Rezeptoren können mit verschiedenen G-Proteinen gekoppelt sein, die unterschiedliche intrazelluläre Signalwege auslösen. Beispielsweise koppelt  $LPA_1$  sowohl an  $G_{\alpha 12/13}$  wie auch an  $G_{\alpha q/11}$  und  $G_{\alpha i/0}$  (Abb.4). Alle fünf LPA-Rezeptoren können an das  $G_{\alpha q/11}$ -Protein gekoppelt sein. Die Aktivierung dieses G-Proteins führt zur Aktivierung der PLC, zur Spaltung von  $PIP_2$  in  $IP_3$  und DAG und zuletzt zur Aktivierung der PKC und zum Anstieg des intrazellulären  $Ca^{2+}$ , das wiederum zu weiteren Signalkaskaden innerhalb der Zelle führen kann (Abb. 4; zusammengefasst in Choi et al., 2010).



#### Abb. 4: Signalweg der fünf LPA-Rezeptoren LPA<sub>1</sub>-LPA<sub>5</sub>.

Die fünf bekannten LPA-Rezeptoren (LPA<sub>1</sub>-LPA<sub>5</sub>) sind GPCR, die durch ihre Aktivierung verschiedene intrazelluläre Signalwege aktivieren können. Sie können alle mit verschiedenen G-Proteinen koppeln, wie die verschiedenfarbigen Pfeile andeuten. Das G<sub>αq/11</sub>-Protein zum Beispiel kann mit jedem der fünf Rezeptoren gekoppelt sein. Die Aktivierung dieses G-Proteins führt zum Beispiel über den PLC-IP<sub>3</sub>-Signalweg zum Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Aus Choi et al., 2010.

#### Der Einfluss von LPA auf Ionenkanäle

Die Signalkaskaden, die durch die Aktivierung der LPA-Rezeptoren in Gang gesetzt werden, aber auch LPA direkt, können Ionenkanäle, die in der Plasmamembran exprimiert werden, regulieren und so die Erregbarkeit der Neurone beeinflussen.

Der K<sub>2</sub>P-Kanal TREK-1 zum Beispiel kann in heterologen Expressionssystemen durch extrazelluläres LPA herunterreguliert werden, vermutlich über den Gq-Protein/PLC-Signalweg (Cohen et al., 2009). Dieser Signalweg soll TREK-1-Kanäle auf verschiedene Wege inhibieren können, z.B. führt das Abnehmen der PIP<sub>2</sub>-Konzentration zu einer Inhibition von TREK-1-Strömen (Lopes et al., 2005), DAG soll direkt TREK-1-Kanäle inhibieren können (Chemin et al., 2003) und auch die PKC soll zu einer Reduzierung von TREK-1-Strömen führen (Murbartian et al., 2005).

In primären afferenten Nozizeptoren kann TRPV1 direkt durch LPA aktiviert werden und zu Schmerzempfinden führen (Nieto-Posadas et al., 2011; Tigyi, 2012). Das

durch LPA verursachte schmerzähnliche Verhalten in wildtypischen Mäusen war in TRPV1-ko-Tieren stark reduziert. Die Aktivierung von TRPV1 durch LPA geschieht direkt durch eine Interaktion von LPA mit dem C-Terminus des Kanals und braucht keine GPCR. Diese direkte Interaktion von LPA mit dem TRPV1-Kanal wurde gezeigt durch Verwendung eines Antagonisten für LPA-Rezeptoren, der strukturell LPA sehr ähnlich ist (BrP-LPA). Dieser Antagonist war in der Lage TRPV1-Ströme hervor zu rufen. Auch Inhibitoren für den GPCR-Signalweg der LPA-Rezeptoren konnten die LPA-induzierte TRPV1-Aktivierung nicht verhindern. Als Interaktionsstelle des LPAs mit dem TRPV1-Kanal wurde die Aminosäure Lysin 710 identifiziert (Nieto-Posadas et al., 2011).

#### **4. Zielsetzungen der Arbeit**

Die erste Schaltstelle des menschlichen Körpers für die Schmerzwahrnehmung sind die DRG-Neurone, in denen der Schmerzreiz zum ersten Mal in ein neuronales Signal umgewandelt wird. Hier ist auch der Ansatzpunkt vieler Schmerztherapien. DRG-Neurone exprimieren Rezeptoren und Ionenkanäle, die an der Nozizeption beteiligt sind. Das Wirken und Zusammenspiel all dieser verschiedenen Faktoren ist noch lange nicht vollständig aufgeklärt und wirft noch viele Fragen auf. Ein paar dieser Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit geklärt werden.

Von vielen Komponenten ist das Expressionsprofil in den DRG-Neuronen bekannt. Gut beschriebene Kandidaten für Ionenkanäle, die sich an der Nozizeption beteiligen, sind die nicht-selektiven TRP-Kanäle, die in DRG-Neuronen exprimiert werden (Caterina et al., 1997) genauso wie die hyperpolarisierenden TRESK-Kanäle (Marsh et al., 2012; Callejo et al., 2013). Bisher ist noch unklar, ob beide Ionenkanaltypen in den selben Zellen vorkommen. Ebenso weiß man von der Expression von GPCR in DRG-Neuronen, die Entzündungsmediatoren binden, z.B. Histamin ( $H_1$ )-, Bradykinin- ( $B_{1/2}$ )- und 5HT-Rezeptoren. Die deutliche Ansammlung von LPA am Entzündungsort wirft die Frage nach der Expression der LPA-Rezeptoren in den Spinalganglien auf.

TRESK-Kanäle sind wichtig für die Stabilisierung des negativen Membranruhepotenzials und können unter anderem durch Gq-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden, wodurch eine Hyperpolarisation der Zelle entsteht. Ob LPA, das während einer Entzündung ausgeschüttet wird, über seine Rezeptoren, die

auch mit dem Gq-Protein koppeln, TRESK-Ströme beeinflussen können, wurde bisher noch nicht gezeigt. Auch welchen Einfluss die LPA-induzierte TRESK-Aktivierung oder die TRESK-Aktivierung durch andere GPCR, die bei Entzündung eine Rolle spielen, auf die Zelle hat, ist noch nicht vollends geklärt.

Es stellt sich ebenfalls die Frage, ob LPA auch andere Mitglieder der TRP-Familie beeinflussen kann, wie z.B. den Entzündungskanal TRPA1.

In dieser Arbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass die durch Entzündung ausgelöste Depolarisierung des Nozizeptors durch die zeitgleiche Aktivierung hyperpolarisierender TRESK-Ströme abgeschwächt werden kann, um so das Neuron vor einer Übererregbarkeit zu schützen. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden elektrophysiologische Eigenschaften wie die Amplitude des Kaliumhintergrundstroms  $I_{K_{SO}}$  und die Erregbarkeit von wildtypischen und funktionellen TRESK[ko]-Mäusen verglichen.

## III. Material

### 1. Biologisches Material

#### 1.1 Versuchstiere

Die Organentnahme an *Xenopus laevis* Fröschen sowie an *Mus musculus* Mäusen wurden nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Unterfranken den Vorgaben des Tierschutzgesetzes entsprechend durchgeführt.

##### **Oozyten**

Für die Oozyten-Präparation wurden wildtypische, weibliche *Xenopus laevis* Frösche verwendet. Die hierfür verwendeten Frösche wurden über Xenopus.com, Vernassal, Frankreich bezogen. Die Frösche wurden in der Tierversuchsanlage am Röntgenring 11 in Würzburg gemäß des Tierschutzgesetzes gehalten und halbjährlich operiert.

##### **DRG-Neurone aus Mäusen**

Für die RNA-Extraktion wurden wildtypische, männliche, 8-10 Wochen alte Mäuse des C3H-Stammes verwendet.

Für die Primärkultur der DRG-Neurone wurden männliche und weibliche adulte, 6-12 Monate alte Mäuse verwendet. Es wurden sowohl wildtypische Mäuse des C3H-Stammes (TRESK[wt]) als auch funktionelle TRESK[G339R] ko Mäuse (TRESK[ko]; Dobler et al., 2007) präpariert.

#### 1.2 Zelllinien

##### **F-11 Zellen**

Die neuronale Zelllinie F-11 wurde unserem Labor von Dr. Jürgen Solinski, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie zur Verfügung gestellt.

##### **HEK-293 Zellen**

Für Immunocytohistochemie wurde die humane embryonale Nierenzelllinie (HEK, human embryonic kidney) HEK-293 verwendet.

## 2. Molekularbiologisches Material

### 2.1 Nukleinsäuren

#### Ionenkanäle und G-Protein gekoppelte Rezeptoren

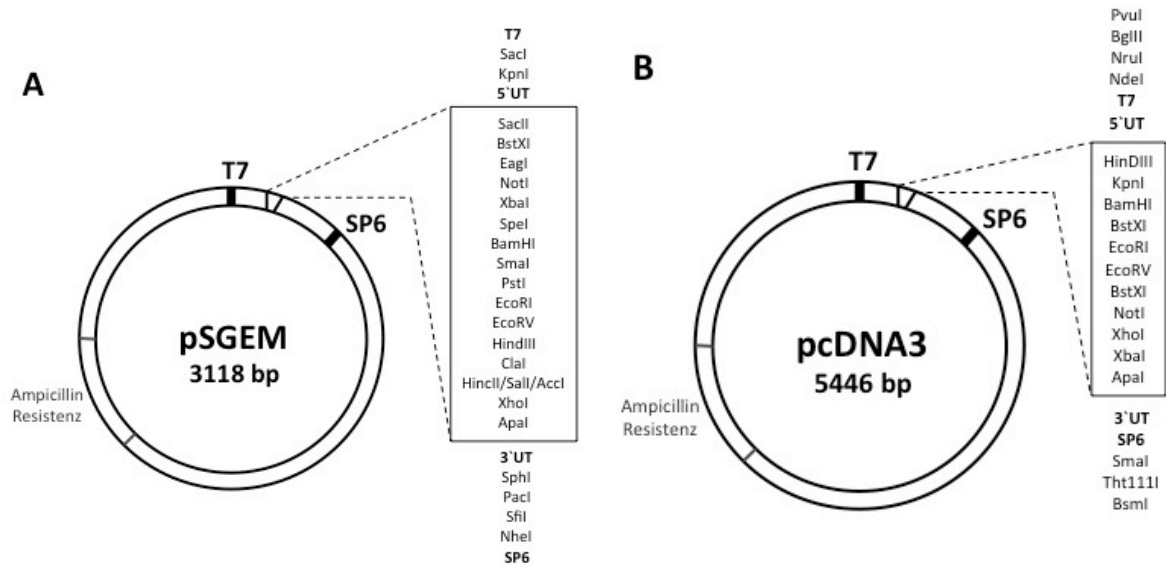
Folgende Ionenkanäle und GPCR der Spezies *Homo sapiens* (h), *Mus musculus* (m) und *Rattus norvegicus* (r) wurden für Experimente verwendet.

mTRESK	NM_207261
hTASK-1	AF_006823
hTREK-1	NM_001017424
mTRPV1	NM_001001445.1
hTRPA1	NM_007332
mLPA <sub>2</sub>	NM_020028
r5HT <sub>2C</sub>	NM_012765
mB <sub>1</sub>	BC_120684
mB <sub>2</sub>	NM_009747.2
mH <sub>1</sub>	NM_008285

Die copyDNA- (cDNA) Klone für mTRPV1 und hTRPA1 wurden von Prof. C. Nau, Anästhesiologische Klinik, Universitätsklinikum Erlangen zu Verfügung gestellt. Die Expressionsvektoren der anderen Ionenkanäle und der GPCR wurden von der AG Molekulare Elektrophysiologie kloniert und standen für die Experimente dieser Arbeit zur Verfügung. Die Klonierung des LPA<sub>2</sub>- sowie des TRPV1-Rezeptors in geeignete Expressionsvektoren ist Teil dieser Arbeit.

#### Vektorplasmide

Für die Transfektion und Injektion wurden zwei Vektorplasmide verwendet, pSGEM und pcDNA3. Der pSGEM-Vektor wurde 1994 von M. Hollmann konstruiert. pSGEM basiert auf dem Vektor pGEM-3Z und besitzt 3'- und 5'-nicht translatierte Regionen des *Xenopus*  $\beta$ -Globins, die den Polylinker flankieren, der aus der multiplen Klonierungsstelle des pBluescript-Vektors stammt. Der pSGEM-Vektor besitzt außerdem vier Restriktionsstellen aufwärts des SP6-Promotors, die für die Linearisierung des Vektors geeignet sind. Der pcDNA3 (Invitrogen) ist ein Expressionsvektor für Säugerzellen, der einen CMV-Promotor besitzt. Beide Vektoren haben eine Ampicillin-Resistenz-Kassette, die für die Selektion heran gezogen wurde (s. Abb. 5).



**Abb. 5: Skizze der verwendeten Vektoren.**

(A) pSGEM-Vektor mit angegebenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme, sowie für die Startpunkte der Polymerasen T7 und SP6. (B) pcDNA3-Vektor mit seinen möglichen Restriktionsenzymen sowie Polymerisierungs-Startpunkten für T7 und SP6.

### Oligonukleotide

Primer für Reverse-Transcription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR); Größe der Produkte ist in Basenpaaren (bp) angegeben:

Ziel DNA	Sense-Sequenz (ss)	Antisense-Sequenz (as)	[bp]
mLPA <sub>1-1</sub>	5'-ttcgccagaggactatgaggatgt-3'	5'-tcggccaggaggaggaagaact-3'	208
mLPA <sub>1-2</sub>	5'-ttcgccagaggactatgaggatgtct-3'	5'-tttgtcgcggtaggagtagatga-3'	253
mLPA <sub>2</sub>	5'-cagcctgctgtcttctactcatg-3'	5'-gtccagcacaccacaaatg-3'	177
mLPA <sub>3</sub>	5'-caacctcctggccttctcatca-3'	5'-gcgctctcgggtattgctgtcctg-3'	378
mLPA <sub>4</sub>	5'-tgcggcagcccagagtc-3'	5'-tcaatgaatttctggaggca-3'	243
mLPA <sub>5</sub>	5'-tgcctgtggtagaaaggagc-3'	5'-tagggaacaacaaggctcagagc-3'	287
mH <sub>1</sub>	5'-ggagatccaggcaaggggt-3'	5'-ccacggtgttagcttgcgc-3'	253
m5HT <sub>2c</sub>	5'-cgattgcagccgagtcggttct-3'	5'-ccgcagtgcccagggtca-3'	223
mB <sub>2</sub>	5'gcgccaatgccctgctcctg-3'	5'-aaagtattggcgatggtgatg-3'	374
mGAPDH	5'-cggcaaattcaacggcacagtcaa-3'	5'-ctttccagaggggccatccacag-3'	424
mTRPA1	5'-cagcctggaatggccttcaattc-3'	5'-gttgaggaacaaggcaacacg-3'	257
mTRPV1	5'-ggcttccatggtgttctccc-3'	5'-cagtgtcactacggctgtgg-3'	180
mTRESK	5'-ggggaaggccaggggatgc-3'	5'-agagcgctcaggaaggaccagt-3'	303
mTREK-2	5'-tgtggatgtattttctacataggtt-3'	5'-ctctgggctggcacact-3'	91
mTASK-1	5'-ctatgccttctacctcct-3'	5'-cccttctgttctcctggtt-3'	92
rTRAAK	5'-ggagcagcctcatgagcagc-3'	5'-ggtagtgtatggtccccg-3'	231
rTREK-1	5'-gcagggtatccccttagg-3'	5'-gatccccaaccagccagtag-3'	203
rTREK-2	5'-gcagggtcagcccggtagg-3'	5'-gaaaccgaagagcgggatccc-3'	183

rTASK-1	5`-agctggagcgcgctcgtgctgc-3`	5`-cccaggctctggaacatgac-3`	204
rTASK-2	5`-ggatcagtgccctgggcaag-3`	5`-gttccactcttccgtcaccatg-3`	182
rTRESK	5`-cagcagctcaagccccagtg-3`	5`-cggccaggatgtccccgatg-3`	208

QuantiTect Primer (Qiagen):

mTRESK	QT00168189
mTREK-1	QT00250229
mTRAAK	QT00102445
mTASK-2	QT01047739

Sonstige Primer:

mTRESK-PQAVADss	5`-gaagccatccctcaggctgtcgtgatgctgggtggatg-3`
mTRESK-PQAVADas	5`-catccacaccagcatcagcgacagcctgagggatggcttc-3`
mTRPV1-ss	5`-gctctagagccaccatggaacaacgggctagctta-3`
mTRPV1-as	5`-cgtgaattcttattctcccctgggacc-3`

### Nukleotide

Name	Hersteller	Bestellnummer
dNTPs Deoxinucleotide Solution	Set NEB	N0446S
Ribonucleoside triphosphate Set	Boehringer	1277057
m <sup>7</sup> G(5`)-ppp(5`)-G-cap	Roche	10904988001

### Größenstandards

Name	Hersteller	Bestellnummer
ssRNA Ladder	NEB	N0362S
Phi X 174 DNA Hae III Digest	NEB	N3026L
Lambd DNA Hind III	NEB	N3012L
100 bp DNA Ladder	NEB	N3231S

## 2.2 Enzyme

### Restriktionsendonukleasen

Name	Hersteller	Bestellnummer
BamHI-HF	NEB	R3136S
DpnI	NEB	R0176S
EcoRI-HF	NEB	R3101S
NheI-HF	NEB	R3131S
PstI	NEB	R0104S
SphI-HF	NEB	R3182S
XbaI	NEB	R0145S
XhoI	NEB	R0146S



**Polymerasen**

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Bestellnummer</u>
Taq PCR Mastermix	Qiagen	1007544
PfuTurbo DNA Polymerase	Agilent Tech.	600252
T7 RNA-Polymerase	Roche	10881775001

**Sonstige Enzyme**

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Bestellnummer</u>
Antarctic Phosphatase	NEB	M0289S
Collagenase Typ 2	Cell Systems	4177
DNaseI recombinant	Roche	04716728001
RNase-freie DNase	Qiagen	79254
T4 DNA Ligase	Roch	10481220001
Trypsin 0,25% in DPBS	PAA	L11-002

**2.3 Antibiotika**

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Bestellnummer</u>
Ampicillin sodium salt	Sigma	A-9518
Gentamicin sulfate salt	Sigma	G055000-1EA
Penicillin/Streptomycin	PAA	P11-010

**2.4 Agonisten und Inhibitoren**

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Bestellnummer</u>
$\alpha$ -Methylserotonin ( $\alpha$ -Met-5-HT)	Sigma	M110
LPA (1-Oleoyl Lysophosphatidic Acid)	Cayman Chemicals	62215
Allyl Isothiocyanate (AITC)	Sigma	377430
Bradikynin acetate salt	Sigma	B3259
Capsaicin	Sigma	360376
Histamine	Sigma	H7125
Lamotrigin	Sigma	L3791
RNase Inhibitor	Roche	0335402001
Serotonin Hydrochloride	Sigma	H9523
U73122	Sigma	46756

### 3. Sonstige Chemikalien

Name	Hersteller	Bestellnummer
3-( <i>N</i> -Morpholino)propan-sulfonsäure (MOPS)	Sigma	M-1254
4',6-Diamidin-2-phenyl (DAPI) Roti-Mount FluorCare	Roth	HP20.1
Adenosintriphosphat (ATP) Mg salt	Sigma	A9187
Bromphenolblau	USB	12370
Bovine serum albumin (BSA) fett-säurefrei	Sigma	A7030
Calciumchloriddihydrate (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma	C3881
Chloroform	Sigma	32211
Diethylpyrocarbonat (DEPC )	Sigma	D5758
D-(+)-Glucose	Sigma	G8270
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma	D8418
Dulbecco`s modified Eagle medium (DMEM) with stable Glutamine	PAA	E15-883
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma	E5134
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Sigma	E-4378
Ethanol	J.T. Baker	8006
Ethidiumbromidlösung 0,025%	Roth	HP 47.1
Ethyl3-aminobenzoate methan-sulfonate (Tricain)	Sigma	E-1052
Fetal Bovine Serum(FBS)	PAA	A15-151
Formaldehydesolution 37%	Sigma	252549
Formamid	Sigma	F-9037
Glycerol	Sigma	G5516
Guanosintriphosphat (GTP)	Sigma	G9002
HEPES	Sigma	H3375
Isofluran	CP Pharma	B145J12A
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma	P4504
konz. Essigsäure (Eisessig)	Sigma	320099
Lysogeny broth- (LB) Agar	Sigma	L-2897
LB-Medium (Lennox)	Roth	X964.1
LE-Agarose	Biozym	840004
Magnesiumchloride (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma	M9272
Methanol	Sigma	32213
Natriumacetat	Sigma	S8750
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel den Hean	31434
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck	6329
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck	1.06498
Natriumpyruvat	Sigma	P2256

Percoll	Amersham Biosciences	17-0891-01
Pferdeserum	Sigma	H1138
Phosphate buffered saline (PBS)	PAA	H15-002
Polyethylenimin (PEI)	Sigma	408727
Poly-L-Lysin 0,01% Solution	Sigma	P4707
Potassiummethansulfonat (CH <sub>3</sub> KO <sub>3</sub> S)	Sigma	83000-250-F
Roti Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth A	156.3
Tris Base	Sigma	T1503
TRPV1-Antikörper polyclonal goat	Santa Cruz	sc-12498

#### 4. Medien, Puffer und Lösungen

Agarplatten	35 g/l 50 µg/ml Ampicillin mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen autoklavieren
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1% DEPC in ddH <sub>2</sub> O ü.N. bei RT rühren autoklavieren
DNA-Marker	20 µl Phi X 174 DNA Hae III Digest 40 µl Lambda DNA Hind III 100 µl TE-Puffer pH7,4 4 µl Probenpuffer 6x für 10 min bei 65°C
DNA-Probenpuffer 6x	0,25% Bromphenol blue 30% Glycerol in ddH <sub>2</sub> O
LB-Medium	25 g/l pH 7,1 autoklavieren
MOPS 5x	0,1 M MOPS 40 mM Natriumacetat 5 mM EDTA pH 8,0 mit DEPC-H <sub>2</sub> O auffüllen pH 7,0

ND96 <sup>+</sup>	ND96 2,5 mM Napyruvat 100 µg/ml Gentamicin pH 7,4
RNA-Probenpuffer	6,5% Formaldehyd 50% Formamid 5% Glycerol 0,1 mM EDTA 0,025% Bromphenolblau mit 1xMOPS auffüllen
TAE 50x (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer)	121 g Tris 28,55 ml Eisessig 50 ml 0,5 M EDTA mit dd H <sub>2</sub> O auf 500 ml auffüllen pH 8,0
TE-Puffer (TRIS-EDTA-Puffer)	10 mM Tris 1 mM EDTA pH8,0
Tricain 0,1%	1g Tricain 1 g NaHCO <sub>3</sub> mit Leitungswasser auf 1 l auffüllen
Zellkulturmedium	450 ml DMEM 50 ml FCS oder Horse Serum 5 ml Penicillin/Streptomycin

## 5. Messlösungen

Badlösung für Säugerzellen	135 mM NaCl 5,4 mM KCl 1,8 mM CaCl <sub>2</sub> 5 mM HEPES 1 mM MgCl <sub>2</sub> mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen pH 7,4
-------------------------------	---

Pipettenlösung für Säugerzellen	120 mM CH <sub>3</sub> KO <sub>3</sub> S 4 mM MgCl <sub>2</sub> 0,5 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM EGTA 10 mM HEPES 3 mM ATP-Mg 0,5 mM GTP-Tris mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen pH 7,2
------------------------------------	---

ND96 für Oozyten	96 mM NaCl 2 mM KCl 1,8 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM HEPES mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen pH 7,4
---------------------	--

ND96 <sup>-Ca<sup>2+</sup></sup> für Oozyten	96 mM NaCl 2 mM KCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM HEPES mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen pH 7,4
---	--

Zur Aktivierung bzw. Inhibition der verschiedenen Rezeptoren und Ionenkanäle in *Xenopus* Oozyten als auch in kultivierten DRG-Neuronen wurden die Messlösungen wie folgt mit den entsprechenden Agonisten und Inhibitoren versetzt:

#### Für TEVC-Messungen an Oozyten

ND96	+ 2,5 nM $\alpha$ -Met5-HT
	+ 100 nM Bradykinin
	+ 100 nM Histamin
	+ 0,05 / 0,1 / 0,2 / 0,5 / 1 / 2 $\mu$ M LPA + 0,1 % BSA
	+ 0,2 $\mu$ M LPA + 100 $\mu$ M Lamotrigin + 0,1 % BSA
	+ 100 $\mu$ M Lamotrigin

ND96 <sup>-Ca<sup>2+</sup></sup>	+ 2,5 $\mu$ M Capsaicin
	+ 2,5 $\mu$ M Capsaicin + 5 $\mu$ M LPA + 0,1 % BSA
	+ 50 $\mu$ M AITC
	+ 50 $\mu$ M AITC + 5 $\mu$ M LPA + 0,1 % BSA
	+ 5 $\mu$ M LPA + 0,1 % BSA

### Für Patch-Clamp-Messungen an DRG-Neuronen

Badlösung	+ 10 $\mu$ M LPA
	+ 30 $\mu$ M Lamotrigin
	+ 10 $\mu$ M LPA + 30 $\mu$ M Lamotrigin
	+ 5 $\mu$ M Capsaicin

## 6. Reaktionskits

Name	Hersteller	Bestellnummer
iScript cDNA Synthesis Kit	Biorad	170-8890
NucleoBond Xtra Midi 50	Machery-Nagel	740410.50
NucleoSpin Plasmid Kit	Machery-Nagel	740588.250
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen	20021
Quick Changell Site-Directed Mut. Kit	Aligent Technologies	200523
Quick Ligation Kit	NEB	M2200S
RNeasy MiniElute Cleanup Kit	Qiagen	74204

## 7. Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Bestellnummer
Deckgläschen 12mm $\emptyset$	Hartenstein	DKRO
Elektrodenglas	WPI Glass replacement 3.5 Nanoltr. Science Products GB150TF-10 with Filament	
Faden	Resorba	PA1016
Pasteurpipetten aus Glas	Brand	747720

## 8. Geräte

Gerät	Firma	Model
Autoklav	Systec	V150
Binokular	Zeiss	Stemi SV11
<i>Brutschränke</i>		
37°C Brutschrank	Hartenstein	Lukra
Oozyten-Brutschrank	Memmet	IPP 30
Schüttelbrutschrank	Edmund Bühler	TH 15
Zellkulturbrutschrank	Thermo Scientific	Hera Cell 240
Feinwaage	Shinko Denshi	PF
Floureszenzlampe	Olympus	4-RFL-T
Gefrierschrank -20°C	Liebherr	
Gefrierschrank -80°C	Thermo Electron Corp.	Forme -86°C
<i>Gelelektrophorese</i>		
Gelkammern	Peqlab	verschiedene
Power Supply	Consort	E861
Gelelektrophorese UV-Detektion	Alpha Innotech Corporation	
Kühlschrank	Siemens	
Mikropipettenpuller	Sutter Instrument	P97
Mikroskop Zellkultur	Olympus	CKX41
NanoDrop UV-Spectrophotometer	PeqLab Biotechnologies	
Nanoinjektor	WPI	Nanoliter 2010
<i>Oozyten Set-up</i>		
Binokular	Wild Heerbrugg	204946
Pumpe	ALA Scientific Instrument	12031041
Verstärker	NPI	TURBO TEC-10 C
<i>Patch-clamp Set-up</i>		
Mikroskop	Zeiss	Axiovert 35
Perfusionssystem	ALA Scientific Instrument	ALA-VM8
Verstärker	EPC 9	Heka
pH-Meter	Hanna	HI991001
Photometer	GeneQuant pro	
Schüttler	Heidolph	Rotamax 120
Sterile Werkbank	Thermo Scientific	Hera safe
Thermoblock	Eppendorf	5436
Thermocycler	Biometra	ProfessionalTrio
Vortexer	Scientific Instrument	VortexGenie2
Wasserbad	Memmert	
<i>Zentrifugen</i>		
Tischzentrifuge	Biozym	Sprout
Zentrifuge mol. Bio.	Kendro	Biofuge pico
Zentrifuge Zellkultur	Sigam Zentrifugen	4K10

## 9. Computerprogramme

ApE Analysis Software, M. Wayn Davis, UT

IGOR Pro 6.3, Wavemetrics, Portland, USA

Office 2011 (Excell, Powerpoint, Word), Microsoft Corporation, Seattle, USA

Photoshop CS4, Adobe Sytems. San Jose, USA

Prism 6, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA

Pulse/Pulsefit, HEKA Elektronik, Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland

Sequenzierservice, Eurofin MWG Operon, München, Deutschland



## IV. Methoden

### 1. Analyse der Genexpression

Um die Genexpression verschiedener GCPR sowie Ionenkanäle in F-11 Zellen und DRG der Maus nachzuweisen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte dieser Analyse beschrieben.

#### 1.1 RNA-Extraktion

Mit Hilfe des RNeasy MiniElute Cleanup Kit wurde die Gesamt-RNA von DRG männlicher C3H Mäuse (8-10 Wochen alt) sowie von Zellen der F-11 Zelllinie extrahiert. Um die Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde die Präparation mit 30 Enzymeinheiten (U) RNase-freier DNase pro Ansatz verdaut. Die Konzentration und die Qualität der RNA (Ratio OD 260/280 > 2,0) wurde mit Hilfe des NanoDrop UV-Spectrophotometers bestimmt. Die Auftrennung durch RNA-Gelelektrophorese zeigte deutliche 28S und 18S ribosomale RNA-Banden, die für eine gute Qualität der Nukleinsäure stehen. Nur intakte RNA-Proben wurden für die Analyse der Genexpression verwendet.

#### 1.2 Reverse Transkription der cDNA

Zur Herstellung von cDNA wurde 1 µg Gesamt-RNA der DRG-Neurone und F-11 Zellen mit dem iScript cDNA Synthesis Kit in einem Endvolumen von 20 µl umgeschrieben. Genspezifische Primer, die ein Intron umfassen, wurden verwendet, um selektive cDNA-Fragmente zu amplifizieren (s. III.2.1; mLPA<sub>1-1</sub>, mLPA<sub>1-2</sub>, mLPA<sub>2</sub>, mLPA<sub>3</sub>, mLPA<sub>4</sub>, mLPA<sub>5</sub>, mH<sub>1</sub>, mB<sub>2</sub>, r5HT<sub>2c</sub>, mTRESK, mTRAAK, mTREK-1, mTREK-2, mTASK-1, mTASK-2, mTRPA1, mTRPV1, rTRESK, rTRAAK, rTREK-1, rTREK-2, rTASK-1, rTASK-2). Es wurden 1 µl cDNA und 1 µl (5 U/µl) Taq Polymerase in einem Gesamtvolumen von 25 µl für die PCR eingesetzt und unter folgenden Bedingungen im Thermocycler inkubiert: Denaturierung für 4 min bei 94°C, anschließend 30 Zyklen mit 1 min bei 94°C, 45 s bei 58-63°C und 45 s bei 72°C, und die finale Elongation für 4 min bei 72°C. Als Positivkontrolle wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mit 25 Zyklen verwendet. Die PCR-Proben wurden anschließend mit Hilfe eines 2 %-Agarosegels analysiert.

## 2. Klonierungen

### 2.1 Einbringen der Kanäle und Rezeptoren in geeignete Vektoren

#### Restriktionsverdau der DNA-Fragmente

Plasmidvektoren und cDNA-Fragmente wurden mit Restriktionsendonukleasen verdaut, um die DNA mit überhängenden Enden zu versehen. Für den Reaktionsansatz wurden 3 µg DNA eingesetzt zusammen mit der entsprechenden Menge an Enzymen (40 U) und Puffern. Die Reaktion wurde gemäß der Angaben der Enzyme bei empfohlener Temperatur und Dauer durchgeführt. Um eine intramolekulare Ligation des Vektors zu vermeiden, wurde die Plasmid-DNA im Anschluss an den Restriktionsverdau mit der alkalischen Antarctic Phosphatase dephosphoryliert (5 U, 30 min bei 37°C). Die alkalische Phosphatase spaltet die endständige 5'-Phosphatgruppe des linearisierten Vektors enzymatisch ab, um eine Selbstligation der Vektorfragmente zu verhindern.

#### Reinigung von DNA-Fragmenten

Zur Abtrennung von Bruchstücken aus dem Restriktionsverdau wurde eine präparative Gelelektrophorese durchgeführt, bei der die gesamte zuvor gewonnene DNA-Menge eingesetzt wurde. Um die DNA zurück zu gewinnen, die in dem präparativen Gel gebunden wurde, wurde mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit die ausgeschnittenen DNA-Banden aufgereinigt. In einem Agarosegel wurde die Ausbeute der Extraktion kontrolliert und die Mengenverhältnisse der DNA-Fragmente für die Ligation bestimmt.

#### Ligation

Um die zu untersuchenden Ionenkanäle und GPCR (im Folgenden als Inserts bezeichnet) in die gewünschten Vektorplasmide zu bringen, wurde die Ligation mit dem Quick Ligation Kit durchgeführt. Für den Ligationsansatz wurden Vektor und Insert, abhängig von ihrer Konzentration, im molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt, das mit Hilfe des analytischen Gels abgeschätzt werden konnte. Zum 20 µl Ligationsansatz gehörten neben Vektor und Insert noch 2 µl Ligationspuffer und sowie 1 µl (3 U) T4 DNA-Ligase. Die Reaktion fand über Nacht bei 16°C statt. Zu jeder Ligation wurde ein Ansatz ohne cDNA-Fragment hergestellt, um den Anteil der Klone, die durch Selbstligation des Vektors entstehen, abzuschätzen.

## **Transformation**

Die ligierten Plasmide wurden in kompetente *E.coli* Bakterienzellen (K-Zellen) transformiert. Hierzu wurden die bei -80°C gelagerten K-Zellen langsam auf Eis aufgetaut, bis eine trübe Zellsuspension entstanden war. In diese Suspension wurde der komplette Ligationsansatz gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 45 s bei 42°C im Thermoblock. Zurück auf Eis wurde zu dem Transformationsansatz 400 µl LB-Medium hinzugegeben und für 1 h bei 37°C im Schüttelbrutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden Teilmengen des Transformationsansatzes (100 und 400 µl) auf Agarplatten, die zur Selektion mit 50 µg/ml Ampicillin versehen waren, ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

## **2.2 Extraktion von Plasmid-DNA aus *E.coli***

### **Präparation der Plasmid-DNA aus *E.coli***

Um die Plasmid-DNA aus den transformierten *E.coli* Bakterien zu isolieren, wurden zunächst einzelne Bakterienkolonien von den Ligationsansätzen gepickt und in 4 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin angeimpft. Die Kulturen wurden anschließend über Nacht bei 37°C im Schüttelbrutschrank inkubiert. Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien wurde das NucleoSpin Plasmid Kit verwendet. Zur Konzentrationsbestimmung der gewonnenen DNA wurden die Proben photometrisch vermessen. Zusätzlich wurde zur Kontrolle der ligierten Fragmente ein Restriktionsverdau durchgeführt wobei die selben Restriktionsenzyme verwendet wurden wie in IV.2.1. Der Verdau wurde mittels der Gelelektrophorese analysiert. Nukleotidsequenzen der neu erstellten Konstrukte wurden durch den Sequenzierservice von Eurofin MWG Operon, München, Deutschland sequenziert und mit der Software ApE analysiert.

### **Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNA**

Zur Gewinnung größerer DNA-Mengen eines gewünschten Konstrukts wurde das NucleoBond Xtra Midi Kit verwendet. Hierfür wurde zunächst eine Über-Tag-Kultur angesetzt, indem einzelne Kolonien von den Agarplatten gepickt wurden und in 4 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin ca. 6-8 h bei 37°C im Schüttelbrutschrank inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden dann 500-1000 µl in 40 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag

wurden die Proben gemäß des Protokolls aufgearbeitet. Zur Kontrolle der Konstrukte wurde wie oben beschrieben eine Restriktion durchgeführt, die ebenfalls anhand der Gelelektrophorese analysiert wurde. Außerdem erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung der gewonnenen DNA-Konstrukte.

### 3. Zielgerichtete Mutagenese

Um die Beteiligung von Calcineurin an der Aktivierung des TRESK-Kanals zu überprüfen, wurde das Bindungsmotiv für die Phosphatase innerhalb des Kanals unter der Verwendung des Quick Changell Site-Directed Mutagenesis Kits mutiert. Hierbei wurde zunächst eine Polymerisierungsreaktion angesetzt, wobei 50 ng der Template-Plasmid-DNA eingesetzt wurde, sowie jeweils 1,4 µl des entsprechenden synthetisierten Primerpaars (10 pmol/µl), 1 µl dNTPs, 5 µl pfu Polymerase Reaktionspuffer und 1 µl (2,5 U) pfu Polymerase (Gesamtvolumen 50 µl). Dieser Ansatz wurde wie folgt im Thermocycler inkubiert: Einleitenden Denaturierung für 1 min bei 95°C, 18 Zyklen: 30 s bei 95°C, 1 min bei 55°C, 8 min bei 68°C. Nach der Polymerisierungsreaktion wurde der Reaktionsansatz mit 1 µl (20 U) des Restriktionsenzym DpnI versetzt und für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Bei diesem Schritt wurde die eingesetzte methylierte Template-DNA verdaut, so dass nur die *in vitro* synthetisierten nicht-methylierten DNA-Stränge übrig blieben. Anschließend wurde die mutierte Plasmid-DNA (mTRESK<sub>[PQAVAD]</sub>), wie in IV.2.1 beschrieben, in K-Zellen transformiert und die vervielfältigte Plasmid-DNA wie in IV.2.2 beschrieben isoliert und analysiert.

### 4. In-vitro Transkription von cRNA

Für die heterologe Expression von Ionenkanälen und Rezeptoren im *Xenopus laevis* Oozyten wurde die copy-RNA (cRNA) der entsprechenden Gene *in vitro* synthetisiert. Hierfür wurden zunächst 20 µg der klonierten DNA mit einem geeignetem Restriktionsenzym (meist NheI, 100 U, 3h bei 37°C) linearisiert und anschließend ein analytisches Gel (0,8 %) zur Kontrolle des kompletten Verdau angefertigt. Die linearisierte DNA wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und anschließend über Nacht bei -20°C mit 1/10 des Volumens Natriumacetat und 2,75-fache des Volumens eiskaltem Ethanol absolut gefällt. Die gefällte, linearisierte DNA

wurde am nächsten Tag für 30 min bei 13.000 Runden pro Minute (rpm) zentrifugiert, mit 500 µl kaltem 70%igen Ethanol gewaschen und nochmals 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene DNA-Präzipitat wurde mit offenem Deckel bei Raumtemperatur getrocknet, bevor es in 25 µl RNase-freies Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O) aufgenommen wurde und die Konzentration photometrisch bestimmt wurde. Für den Transkriptionsansatz wurden 3 µg der gefällten, linearisierten DNA eingesetzt. Zu den 3 µg DNA wurden noch jeweils 5 µl ATP, CTP, UTP, GTP+m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G-cap und Transkriptionspuffer (10x) sowie jeweils 2,5 µl RNase-Inhibitor und T7 RNA-Polymerase (20 U/µl) gegeben. Der Transkriptionsansatz wurde mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf insgesamt 50 µl aufgefüllt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl DNase (10 U/µl) hinzugefügt und für weitere 15 min bei 37°C inkubiert, um die Matrizen-DNA abzubauen. Die nun entstandene cRNA wurde wie oben beschrieben wieder mittels der Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und ebenfalls über Nacht bei -20°C mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Am nächsten Tag wurde sie zentrifugiert, gewaschen, getrocknet und in 10-20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Qualitäts- und Quantitätskontrolle der cRNA geschah mittels eines denaturierende Formaldehyd-Agarosegels. Zum 200 µl RNA-Probenpufferaliquot wurde 1 µl Ethidiumbromid gegeben. Zu 2 µl jeder cRNA-Probe sowie zu 3 µl ssRNA-ladder wurden 8 µl des mit Ethidiumbromid versetzten Probenpuffers zugefügt. Zur weiteren Denaturierung wurden cRNA-Proben sowie die ssRNA-ladder für 10 min bei 65°C im Thermoblock inkubiert, bevor sie auf das RNA-Gel aufgetragen wurden. Als Laufpuffer für die RNA-Gelelektrophorese diente 1xMOPS-Puffer.

## 5. Heterologe Genexpression in Oozyten von *Xenopus laevis*

Um die Kopplung von GPCR an Ionenkanäle zu untersuchen wurde die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Two-Electrode-Voltage-Clamp, TEVC) an Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* durchgeführt. Vorteile dieses heterologen Expressionssystems sind die Größe (1-1,5 mm im Durchmesser) der Oozyten und damit die einfache Handhabung, die Oozyten führen nach Injektion von cRNA die Translation und posttranslationale Schritte sowie den Einbau der Proteine in die Zellmembran zuverlässig durch und naive Oozyten erzeugen kaum Eigenstrom

mit Ausnahme von  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridströmen, die leicht von Kationenströmen unterschieden werden können.

### 5.1 Präparation der Oozyten

Die Oozyten wurden während einer Operation dem weiblichen *Xenopus laevis* Krallenfrosch entnommen. Der zu operierende Frosch wurde für 15-25 min in eine 0,1%ige Tricain-Lösung gelegt, bis er vollständig betäubt war. Für die anschließende Operation wurde der Frosch in Rückenlage auf Eis gelegt. Mit einem Skalpell wurde auf einer Seite des Bauches im unteren Drittel ein ca. 1 cm langer Schnitt durch die äußere und innere Hautschicht sowie das darunterliegende Fettgewebe geführt. Direkt unter dem Schnitt waren nun die Oozyten sichtbar und konnten mit einer Pinzette herausgenommen werden. Bei jeder Operation wurden mehrere 100 Oozyten entnommen und in  $\text{ND96}^+$ -Lösung gelegt. Die innere und äußere Hautschicht des Frosches wurde mit einem resorbierbaren Faden durch 2-3 Stiche vernäht. Nach der OP wurde der Frosch in eine mit feuchten Tüchern gefüllte Glaskammer gesetzt und wachte unter Beobachtung wieder auf. Das herauspräparierte Ovar wurde in kleine Segmente geschnitten und in eine Collagenase-Lösung (10 U Collagenase in 20 ml  $\text{ND96}^{-\text{Ca}^{2+}}$ ) überführt und für ca. 3 h auf dem Schüttler mit 50 rpm bei Raumtemperatur inkubiert, bis sie vereinzelt und defollikuliert waren. Anschließend wurden die vereinzelt Oozyten dreimal mit  $\text{ND96}^+$  sowie zweimal mit  $\text{ND96}^+$  gewaschen und dann bis zur Injektion bei  $19^\circ\text{C}$  in  $\text{ND96}^+$ -Puffer aufbewahrt.

### 5.2 Injektion der cRNA

Für die Injektion mit cRNA wurden Oozyten des Reifestadiums V und VI ausgewählt (Dumont, 1972). Unter stereomikroskopischer Beobachtung wurde die cRNA durch die Kolbenpumpe des Injektors in die Oozyten injiziert. Hierfür wurden die Injektionskapillaren mit dem Mikropipetten-Puller gezogen und anschließend mit einer Federschere abgeschnitten, so dass eine Spitze mit einem ca. 2-5  $\mu\text{m}$  großem Außendurchmesser entstand. Diese zugeschnittenen Injektionskapillaren wurden luftblasenfrei mit Mineralöl gefüllt und über den Stempel der Injektionsanlage gezogen. Mit Hilfe der Injektionsanlage wurden nun 1-2  $\mu\text{l}$  der cRNA (150-250  $\text{pg}/\mu\text{l}$ ) in gewünschter Verdünnung in die Injektionskapillare gefüllt. In die Oozyten wurde eine definierte Mengen von 23,0 bis 41,0 nl cRNA (das entsprach ca. 5-8  $\text{pg}$  cRNA

pro Oozyte) injiziert. Bei Doppelinjektion von Proteinen, die eine gleiche Expressionsdauer haben, wurde die cRNA vor der Injektion in einem entsprechenden Verhältnis gemischt und anschließend zusammen injiziert. Bei Doppelinjektionen mit Proteinen unterschiedlicher Expressionsdauer wurden jeweils Einzelinjektionen der Proteine an unterschiedlichen Zeitpunkten in die selbe Oozyte durchgeführt. Die injizierten Oozyten wurden für 48-72 h in ND96<sup>+</sup> Lösung bei 19°C kultiviert.

### 5.3 Kultivierung der Oozyten

Die Oozyten wurden in 12-Well-Platten mit ND96<sup>+</sup> Lösung bei 19°C bis zur Messung aufbewahrt (5-10 Oozyten in einem Well). Täglich erfolgte eine visuelle Kontrolle der injizierten Oozyten, wobei schlechte Oozyten aussortiert wurden. Wenn nötig wurde die ND96<sup>+</sup> Lösung gewechselt.

Für die Hemmung der PLC wurden die mit mTRESK injizierten Oozyten für 20 min in ND96 mit 10 µM U73122 inkubiert

## 6. Zellkultur und Transfektion

Für elektrophysiologische Messungen mit der Patch-Clamp Technik wurden F-11 Zellen und Primärzellen aus DRG von Mäusen verwendet.

### 6.1 F-11 Zellen

Die F-11 Zelllinie ist eine immortalisierte Zelllinie, die aus DRG-Neuronen der Ratte und Glioblastomazellen der Maus entstanden ist (Platika et al., 1985). Diese Zellen exprimieren endogene Ionenkanäle, wie spannungsgesteuerte Human-ether-a-go-go-related-Gen- (HERG) K<sup>+</sup>- und Natrium- (Na<sup>+</sup>) Kanäle (Chiesa et al., 1997), Ca<sup>2+</sup>-aktivierte K<sup>+</sup>-Kanäle (Naruse et al., 1992) sowie den temperatursensitiven TRPV2 Kanal (Bender et al., 2005). Da es sich um eine etablierte, stabile, neuronale Zelllinie handelt, wurde sie für Patch-Clamp Messungen verwendet.

#### Kultivierung und Transformation der F-11 Zelllinie

F-11 Zellen wurden im Zellkulturmedium für Säugerzellen mit FBS bei 37°C mit 5 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) im Zellkulturbrutschrank kultiviert. Konfluent bewachsene Kulturschalen wurden passagiert und mit einer Zellzahl von 1x10<sup>5</sup> (Neubauerzählkammer) in eine 100 mm Kulturschale neu ausgesät.

### **Transfektion der F-11 Zellen**

Für die Transfektion der F-11 Zellen wurden vereinzelte Zellen in kleinen Petrischalen (35 mm Ø) auf 2-4 mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen in einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  und  $1 \times 10^5$  in 2 ml Kulturmedium ausgesät und über Nacht im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> stehen gelassen, damit sich die Zellen absetzen konnten. Am folgenden Tag wurde der Transfektionsmix auf die Zellen aufgetragen. Dieser bestand aus 150 µl DMEM, 3 µg DNA (GFP/Plasmid 1:1) sowie 12 µl PEI (1 µg/ml). Als Transfektionskontrolle wurden Zellen nur mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) (2 µg) ohne Plasmid-DNA transfiziert. Der Transfektionsmix wurde 15 x 1 s gevortext und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor zusätzliche 850 µl Zellkulturmedium mit FBS hinzugefügt wurden. Die Deckgläschen mit den anheftenden Zellen wurden mit PBS gewaschen. Der gesamte Transfektionsansatz wurde auf die Zellen gegeben und nach 2-3 h Inkubation im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden noch 2 ml Zellkulturmedium mit FBS hinzugefügt. Nach 2-3 Tagen im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen für elektrophysiologische Messungen verwendet.

## **6.2 Primärkultur von DRG-Neuronen**

Für die Primärkultur muriner DRG-Neurone wurden männliche und weibliche adulte Mäuse verwendet. Es wurden sowohl von wildtypischen Mäusen des C3H Stammes (TRESK[wt]) als auch von funktionalen TRESK[G339R] knockout Mäusen (TRESK[ko]; (Dobler et al., 2007) Neuronenkulturen angelegt und analysiert.

### **Präparation der DRG-Neurone**

Die Kultivierung der DRG-Neurone wurde, mit einigen kleinen Modifikationen, wie von Petersen und Mitarbeitern (Petersen et al., 1996) beschrieben, durchgeführt. Die Mäuse wurden mit Isofluran betäubt und im Anschluss durch zervikale Dislokation euthanasiert. Postmortal wurde die Wirbelsäule heraus präpariert und in PBS gewaschen. Die folgenden Präparationsschritte wurden in DMEM durchgeführt, das zur Versorgung der Zellen diente. Aus der freigelegten Wirbelsäule wurden nun die Spinalganglien verschiedener Segmente (zervikales Segment C1 – lumbales Segment L5) entnommen und von überschüssigen Gewebe gesäubert. Die



gesäuberten Spinalganglien wurden in 10 ml einer 0,1%igen Collagenase-Lösung überführt und für 2 h im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die folgenden Schritte wurden unter der sterilen Werkbank durchgeführt. Nach dem Collagenase-Bad wurden die Ganglien mit PBS gewaschen und anschließend 11 min bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in 0,25%iger Trypsin-Lösung inkubiert. Nach einem weiteren Waschgang mit PBS wurden die Ganglien mit einer abgerundeten sterilen Pasteurpipette trituiert, um die Ganglienstruktur aufzulösen. Die dadurch entstandene Zellsuspension wurde durch eine 20%ige Percoll-Lösung bei ca. 670 G für 5 min zentrifugiert. Hierbei war es wichtig die Bremse der Zentrifuge auszuschalten, damit die Trennung der Zellen und Zellfragmente nicht abrupt abgebrochen wurde. Die Spinalganglien waren nun als Präzipitat am Boden des Zentrifugenröhrchens sichtbar. Das Zellpräzipitat wurde zweimal mit 8 ml PBS gewaschen und zuletzt in soviel Zellkulturmedium mit Pferdeserum aufgenommen, um je 25 µl Zellsuspension auf Poly-L-Lysin-beschichtete und mit PBS gewaschene Deckgläschen auszusäen. Pro Präparation wurden 8-12 Deckgläschen (je 3-4 Deckgläschen pro 35 mm Petrischale) verwendet. In den Petrischalen wurden nun die mit DRG-Neuronen bedeckten Deckgläschen für 30-60 min in den Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> gestellt, damit sich die Zellen absetzen und anheften konnten. Abschließend wurden 2 ml Zellkulturmedium mit Pferdeserum in die Petrischalen gegeben und die Kulturen wurden bis zum Versuchsbeginn im Zellkulturbrutschrank aufbewahrt.

### **Kultivierung der DRG-Neurone**

Die DRG-Neuronenkultur wurde täglich visuell kontrolliert. Das Zellkulturmedium mit Pferdeserum wurde alle 3-4 Tage ausgetauscht. Hierbei wurden von den 2 ml des alten Mediums ca. 1/3 beibehalten und 2 ml frisches Zellkulturmedium hinzugegeben. Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten 2-7 Tage nach der Präparation.

## **7. Elektrophysiologie**

Um das elektrophysiologische Verhalten der verschiedenen Zellen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedenen elektrophysiologische Methoden angewandt. Für die Analyse der in *Xenopus* Oozyten exprimierten Rezeptoren und Kanäle wurde die TEVC verwendet. Um das elektrophysiologische Verhalten der F-

11 Zellen und der kultivierten DRG-Neurone zu analysieren wurde die Patch-Clamp Technik angewendet.

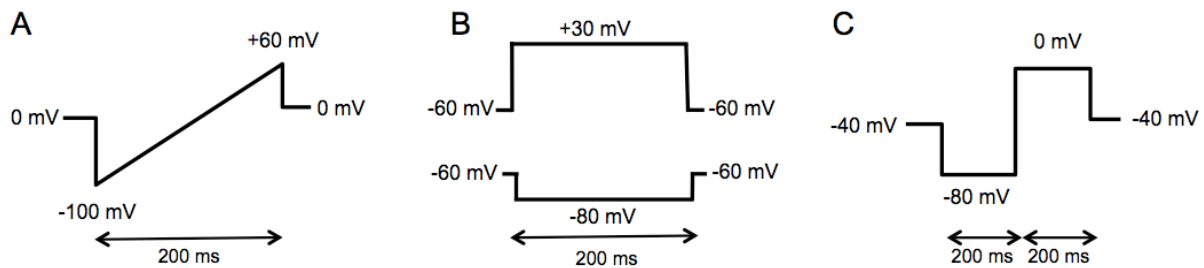
### **7.1 Zwei-Elektrode-Spannungsklemme der *Xenopus* Oozyten**

Bei der TEVC handelt es sich um eine elektrophysiologische Methode, um Ionenströme und die Leitfähigkeit an Membranen erregbarer Zellen zu messen. Für die beiden Elektroden, die Spannungs- und Stromelektrode, wurden Glaskapillare aus Borosilikat mit Filament benutzt. Diese wurden mit dem Micropipetten-Puller erzeugt und anschließend unter einem Binokular mit einer Federschere so abgeschnitten, dass sie später einen Widerstand von 1-3 M $\Omega$  aufwiesen. Anschließend wurden die Glaskapillaren mit 3 M KCl luftblasenfrei befüllt und über die chlorierten Silberelektroden gezogen. Die zu untersuchenden Oozyten wurden in eine kleinvolumige Perfusionskammer platziert, die mit einem Perfusionssystem verbunden war, das einen konstanten Durchfluss der verschiedenen Messlösungen ermöglichte. Für die Messungen wurde ein TURBO TEC-10 C Verstärker verwendet. Die Stimulation und Datenerhebung wurde durch die Software Pulse/Pulsefit auf einem Macintosh Computer kontrolliert. Die Datenanalyse wurde mit der Software IGOR Pro durchgeführt.

#### **Messprotokolle für Oozyten (TEVC)**

Für die TEVC-Messungen an Oozyten wurden folgende Messprotokolle verwendet: Spannungsrampen von -100 bis +60 mV (Abb. 6, A), einfache „Many Jumps“-Messungen (Maju; Abb. 6, B) und Maju-Messungen mit alternierenden Sprüngen zu -80 und 0 mV (Abb. 6, C). Anhand der Spannungsrampen (Abb. 6, A) konnte erkannt werden, ob die Oozyten K<sub>2</sub>P-Kanäle exprimierten, da K<sub>2</sub>P-Kanäle mit dem Umkehrpotenzial von ca. -80 mV bei Membranpotenzialen > -80 mV einen immer größer werdenden Kaliumauswärtsstrom erzeugen. Bei den einfachen Maju-Messungen erfolgte ausgehend von einem Haltepotenzial von -60 mV im Abstand von 3 s Sprünge auf ein Potenzial von +30 mV bei Messungen von K<sub>2</sub>P-Kanäle (Abb. 6, B oben), da diese Kanäle bei diesem Membranpotenzial einen großen Kaliumauswärtsstrom erzeugen. Für Messungen von TRP-Rezeptoren wurden Membranpotenzialsprünge auf -80 mV erzeugt, da TRP-Kanäle bei diesem Potenzial ein einwärtsgerichteten Kationenstrom aufweisen (Abb. 6, B unten). Die Aufzeichnung des gemessenen Stromes erfolgte in jedem 3 s Intervall. Bei Maju-Messungen für Doppelinjektionen von TRESK und einem TRP-Kanal wurden

alternierende Sprünge zu den beiden Umkehrpotenzialen von einmal TRESK (-80 mV) und einmal TRP-Kanälen (0 mV) erzeugt und erlaubten die selektive Aufnahme der TRP-Ströme bei -80 mV und die der TRESK Ströme bei 0 mV. Die eingefügte gestrichelte Linie in den Originalableitungen markiert 0 mV.



**Abb. 6: Messprotokolle für Messungen in *Xenopus* Oozyten.**

(A) Spannungsrampen von -100 bis +60 mV über 200 ms. (B) Maju-Protokolle. Wenn nicht anders angegeben, wurde die Oozyte auf -60 mV geklemmt. Ausgehend vom Haltepotenzial erfolgten im Abstand von 3 s Sprünge auf ein Potenzial von +30 mV für K2P-Kanäle (oben) oder -80 mV für TRP-Rezeptoren (unten) für 200 s. Die Aufzeichnung des gemessenen Stroms erfolgte in jedem 3 s Intervall. (C) Maju-Protokoll bei Doppelinjektionen von TRESK und einem TRP-Kanal. Alternierende Sprünge zu den beiden Umkehrpotenzialen von TRESK (-80 mV) und TRP-Kanälen (0 mV) erlaubte die selektive Aufnahme der TRP-Ströme bei -80 mV und die der TRESK Ströme bei 0 mV.

## 7.2 Elektrophysiologie der F-11 Zellen und primären DRG-Neurone

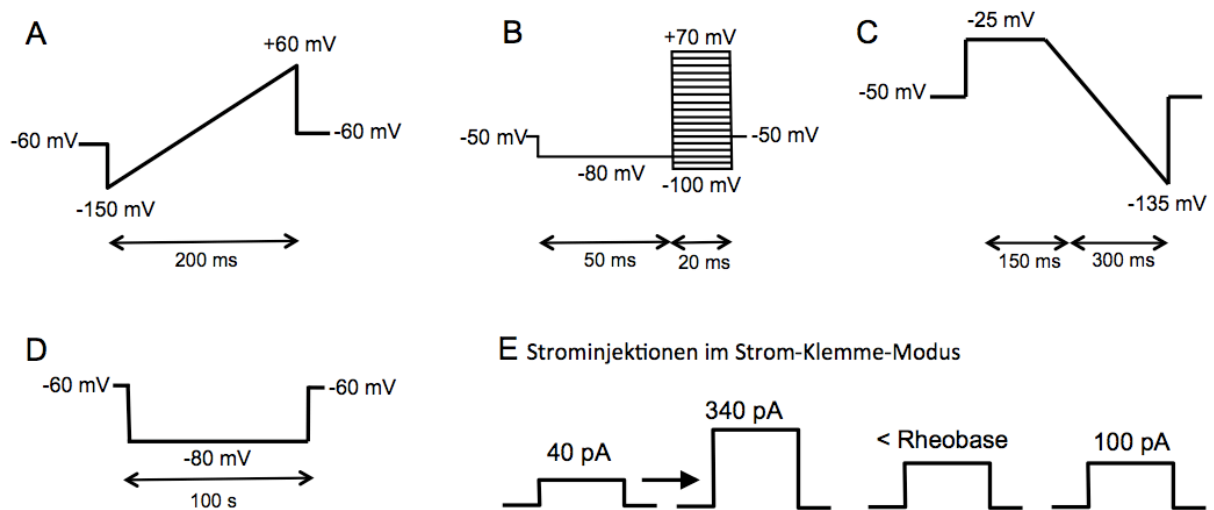
Für die elektrophysiologischen Messungen an F-11 Zellen und primären DRG-Neuronenkulturen wurde die Patch-Clamp Technik im Ganzzell-Modus eingesetzt. Mit dieser Methode ist es möglich, Ionenströme der gesamten Zellmembran zu messen, wie schon 1981 von Hamill und Kollegen beschrieben (Hamill et al., 1981). Auch hier wurden Glaskapillaren aus Borosilikat mit integriertem Filament verwendet, die ebenfalls mit dem Micropipetten-Puller erzeugt wurden, um später einen Widerstand von 3-7 M $\Omega$  zu erhalten. Diese Glaskapillaren wurden mit Pipettenlösung luftblasenfrei befüllt, bevor sie über die chlorierte Silberelektrode gezogen wurde. Die Deckgläschen mit den ausgesäten Zellkulturen wurden in einer mit Badlösung gefüllten 35 mm Petrischale so unter dem Mikroskop platziert, dass Elektrode und Perfusionssystem leicht an die Zellen herangeführt werden konnten. Die Ströme und Membranspannungen wurden mit einem EPC 9 Patch-Clamp Verstärker

aufgenommen und mit 1-2 kHz gefiltert. Für Stimulation und Datenerhebung wurde ebenfalls die Software Pulse/Pulsefit auf einem Macintosh Computer benutzt. Die Datenanalyse wurde mit der Software IGOR Pro durchgeführt.

### **Messprotokolle für Säugerzellen (Patch-Clamp)**

Für Patch-Clamp-Messungen an F-11 Zellen und DRG-Neuronen der Maus wurden folgende Messprotokolle verwendet: Spannungsrampen von -150 bis +60 mV (Abb. 7, A), depolarisierende 10 mV-Spannungssprünge von -100 bis +70 mV nach einer Hyperpolarisierung auf -80 mV ( $I_{V_{Na}}$ -Messungen; Abb. 7, B), inverse Rampe zur Messung des  $I_{K_{SO}}$  (Abb. 7, C), Langzeitableitung für 100 s bei einem Haltepotenzial von -80 mV (Abb. 7, D) sowie verschiedene Strominjektionen im Strom-Klemme-Modus zu Erregung neuronaler Zellen (Abb. 7, E).

Mit Hilfe der Spannungsrampen zeigte sich das elektrophysiologische Verhalten der Zellen bei unterschiedlichen Membranpotenzialen (Abb. 7, A). Durch die depolarisierenden Spannungssprünge von -100 bis +70 mV nach einer Hyperpolarisation auf -80 mV in Abbildung 7 B können in neuronalen Zellen spannungsgesteuerte  $Na^+$ - und  $K^+$ -Ströme aktiviert werden. Das Messprotokoll der inversen Rampen (Abb. 7, C) wurde zur Messung des  $I_{K_{SO}}$  in DRG-Neuronen verwendet. Ausgehend von einem Membranpotenzial von -50 mV erfolgte ein 150 ms dauernder Depolarisierungsschritt auf -25 mV. Darauf folgte eine hyperpolarisierende Rampe auf -135 mV. Am Ende des Depolarisierungsschrittes konnte der  $I_{K_{SO}}$  bestimmt werden. Bei Langzeitableitung mit einem Haltepotenzial von -80 mV konnte die Aktivität der TRPV1-Rezeptoren bei der Zugabe von Capsaicin beobachtet werden (Abb. 7, D). Um Aktionspotenziale zu erzeugen, wurde im Strom-Klemme-Modus mit Strompulsen gearbeitet (Abb. 7, E). In F-11 Zellen wurden Strominjektionen von 40 – 340 pA benutzt, um Aktionspotenziale auszulösen (Abb. 7, E, links). Um DRG-Neurone etwas zu depolarisieren, um sie anschließend durch LPA aktivieren zu können, wurden Strompulse verwendet, die etwas kleiner waren als der entsprechende Rheobasestrom der Zelle (Abb. 7, E, Mitte). Zur Auslösung von Aktionspotenzialfrequenzen in DRG-Neuronen wurden Strompulse von 100 pA injiziert (Abb. 7, E, rechts). Die eingefügte gestrichelte Linie in den Originalableitungen markiert 0 mV.



**Abb. 7: Messprotokolle für F-11 Zellen und DRG-Neurone.**

(A) Spannungsrampen von -150 bis +60 mV über 200 ms. Wenn nicht anders angegeben, wurde die Zelle auf -60 mV geklemmt. (B) Spannungssprünge (IV<sub>Na</sub>). Ausgehend von einem Haltepotential von -50 mV kam es zu einer Hyperpolarisierung auf -80 mV für 50 ms, anschließend folgte eine Serie von Spannungssprüngen für jeweils 10 ms, Testpulsbereich: -100 mV bis +70 mV, Inkrement: 10 mV. (C) Inverse Rampe zur Messung des I<sub>KSO</sub>. Ausgehend von einem Membranpotential von -50 mV erfolgte ein 150 ms dauernder Depolarisierungsschritt auf -25 mV. Darauf folgte eine hyperpolarisierende Rampe bis -135 mV. Der I<sub>KSO</sub> konnte am Ende des Depolarisierungsschrittes gemessen werden. (D) Langzeitableitung für 100 s bei einem Haltepotential von -80 mV. (E) Strompulse während Current-Clamp-Messungen. Es erfolgten Strompulse entweder zwischen 40 und 340 pA, kurz unterhalb des Rheobasestromes oder von 100 pA.

## 8. Statistische Datenanalyse

Die in dieser Arbeit ermittelten Werte wurden als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben, unter der Anzahl (n) durchgeführten Messungen. Zur Auswertung der Ergebnisse und Untersuchung auf statistisch signifikante Unterschiede wurde das Programm Prism6 verwendet. Zur Überprüfung der Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewendet. Bei Normalverteilung wurde der Student's T-Test herangezogen, bei nicht-Normalverteilung der Werte wurde der Wilcoxon's Rank Test und der Mann-Whitney-U Test verwendet. Bei p-Werten  $\leq 0,05$  wurden die Ergebnisse als signifikant unterschiedlich (\*) bewertet, bei  $p \leq 0,01$  als hochsignifikant (\*\*).

Zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurve wurde die Hill-Funktion angewandt.

$$y = E_{\min} + (E_{\max} - E_{\min}) / [1 + (EC_{50}/c)^{n_H}]$$

$E_{\max}$  = Effekt bei maximaler Konzentration der Substanz

$E_{\min}$  = Effekt bei minimaler Konzentration der Substanz

$EC_{50}$  = Konzentration, bei der ein halb-maximaler Effekt eintritt

$c$  = Konzentration der Substanz

$n_H$  = Hill-Koeffizient

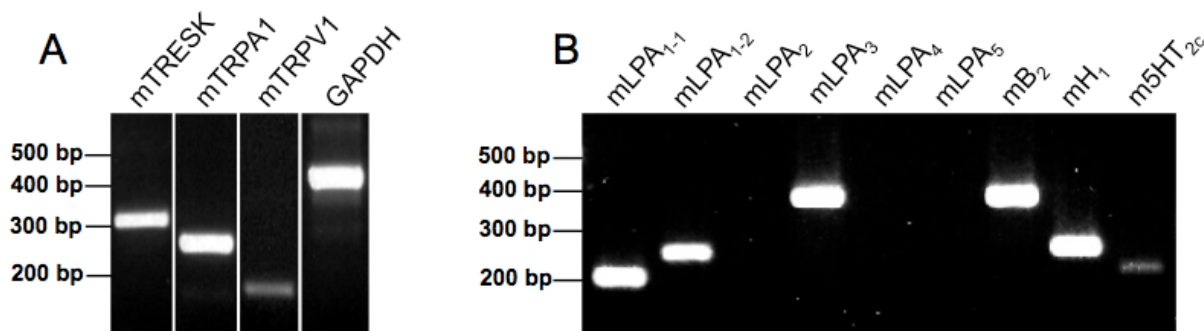
Die Auswertung des halbmaximalen Effekts  $EC_{50}$  und die graphische Darstellung der Dosis-Wirkungskurve erfolgte durch das Programm IGOR Pro 6.3 (Wavemetrics, Portland, USA).

## V. Ergebnisse

### 1. Expressionsmuster in DRG-Neuronen

#### 1.1 Expressionsmuster von Ionenkanälen und Rezeptoren

Während einer Entzündungsreaktion werden viele verschiedene entzündungsfördernde Mediatoren ausgeschüttet, die sowohl Rezeptoren als auch Ionenkanäle beeinflussen. Um festzustellen, ob Rezeptoren für diese Substanzen bedeutsam für die Regulation bestimmter Ionenkanäle in DRG-Neuronen sein könnten, wurde ihre Ko-Expression in Spinalganglien mit RT-PCR überprüft.



#### Abb. 8: Expressionsprofil von Ionenkanälen und GPCR.

Es wurde cDNA aus der Gesamt-RNA von DRG-Neuronen junger Mäuse erstellt. Diese cDNA wurde für RT-PCR mit intronübergreifenden Primern benutzt. (A) Die Ionenkanäle TRESK, TRPA1 und TRPV1 waren ko-exprimiert in Spinalganglien. (B) Neben der GPCR B<sub>2</sub>, H<sub>1</sub> und 5HT<sub>2c</sub> wurden auch die LPA-Rezeptoren LPA<sub>1-1</sub>, LPA<sub>1-2</sub> und LPA<sub>3</sub> nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurde GAPDH verwendet. Zu jedem Primerpaar wurden Negativkontrollen mit H<sub>2</sub>O durchgeführt. Alle H<sub>2</sub>O-Proben waren negativ.

Gut bekannte Kandidaten für Ionenkanäle, die während einer Entzündungsreaktion aktiviert werden, sind die nicht-selektiven TRP-Kanäle. TRPV1-Rezeptoren detektieren und vermitteln Hitzeschmerz (Caterina et al., 1997). Der TRPA1-Rezeptor spielt bei Entzündung eine entscheidende Rolle, sowohl als Detektor als auch als Initiator für Entzündungsreaktionen (Bautista et al., 2012). Neben den TRP-Kanälen werden auch noch andere Ionenkanäle von Entzündungsmediatoren und

deren GPCR aktiviert und können die Nozizeption beeinflussen, wie z.B. TRESK-Kanäle (Marsh et al., 2012; Callejo et al., 2013). Wie in Abbildung 8 A zu sehen ist, konnten beide TRP-Rezeptoren (TRPA1 und TRPV1) durch die Verwendung intronübergreifender Primer (s. III.2.1) ko-exprimiert mit dem TRESK-Kanal in Spinalganglien nachgewiesen werden. Die H<sub>2</sub>O-Kontrollen zu allen Primer-Paaren waren negativ (Daten nicht gezeigt). Als Positivkontrolle wurde ein GAPDH-Primerpaar verwendet.

TRESK-Kanäle können durch erhöhtes intrazelluläres Ca<sup>2+</sup>, das durch Aktivierung Gq-gekoppelter Rezeptoren entsteht, aktiviert werden (Czirjak et al., 2004; Mathie, 2007). Abbildung 8 B zeigt Gq-gekoppelte Rezeptoren, die durch entzündungsfördernde Substanzen aktiviert werden können. Intronübergreifende Primerpaare führten zum Nachweis von H<sub>1</sub>-, B<sub>2</sub>- und 5HT<sub>2C</sub>-Rezeptoren in Spinalganglien. Zusätzlich wurde auch die Expression der LPA-Rezeptor-Isoformen LPA<sub>1-1</sub>, LPA<sub>1-2</sub> und LPA<sub>3</sub> belegt, während die Rezeptoren LPA<sub>2</sub>, LPA<sub>4</sub> und LPA<sub>5</sub> nicht nachgewiesen werden konnten (Abb. 8, B).

Die RT-PCR mit den intronübergreifenden Primerpaaren ist ein qualitativer Nachweis der Ionenkanäle und GPCR in Spinalganglien. Die Größe der DNA-Banden sagt nichts über die Quantität der Expression aus.

So zeigten die Versuche von Abbildung 8 sehr deutlich, dass in DRG-Neuronen von adulten Mäusen Gq-gekoppelte Rezeptoren und Ionenkanäle, die für die Nozizeption unter Entzündungsbedingungen wichtig sind, auf RNA-Ebene nebeneinander vorhanden sind und sich somit gegenseitig beeinflussen können.

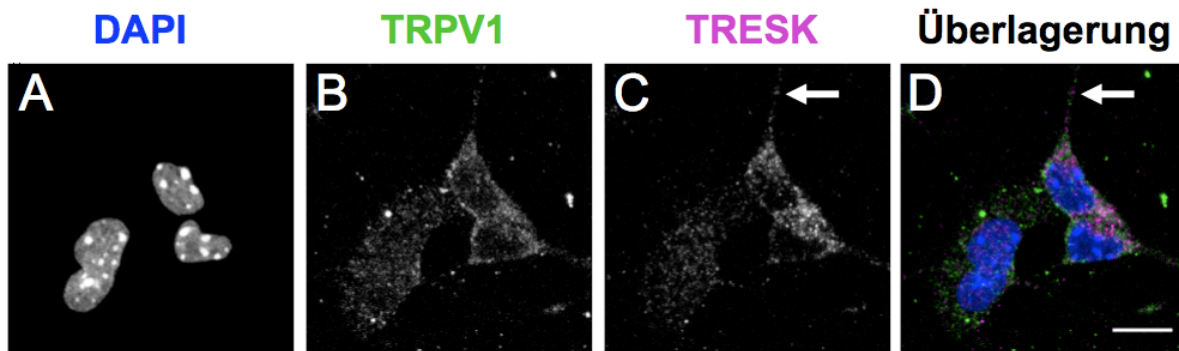
## 1.2 Detektion von TRESK- und TRPV1-Kanalproteinen mit Immuncytochemie

Um die Expression des TRESK-Kanals auf Protein-Ebene nachzuweisen, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein spezifischer Antikörper gegen ein 68 Aminosäure-Polypeptid von einer mTRESK-Untereinheit entwickelt (F. Döring, nicht publiziert). Der TRESK-Antikörper zeigte in transfizierten HEK-293 Zellen seine hohe Spezifität und wurde im Folgenden auch für DRG-Neurone von Mäusen verwendet.

Für den Nachweis und die Lokalisation von TRESK-Proteinen wurden DRG-Neurone kultiviert und immuncytochemisch gefärbt. Diese Versuche wurden in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Sendtner am Institut für



Klinische Neurobiologie, Universitätsklinikum Würzburg, von Dr. Benjamin Dombert durchgeführt. Für die Immunocytohistochemie wurden DRG-Neurone von E13.5 Maus Embryos (siehe Jablonka et al., 2006) auf Deckgläschen ausgesät und kultiviert. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (Abb. 9, A).



**Abb. 9: Detektion des TRESK Kanalproteins mit Hilfe eines neu entwickelten Antikörpers.**

Kultivierte embryonale DRG Neurone der Maus wurden (A) mit DAPI, (B) mit einem TRPV1 Antikörper und (C) mit dem neuen TRESK Antikörper gefärbt. (D) Überlagerung der drei Färbungen. TRESK und TRPV1 Färbung zeigte eine Ko-Lokalisation beider Kanäle sowohl im Soma als auch in den axonalen Ausläufern (siehe Pfeile in C und D).

In Präparationen von Primärzellen aus embryonalen Spinalganglien wurden sensorische Neurone, Gliazellen und Fibroblasten isoliert und zusammen kultiviert. Wurden diese Kulturen mit dem TRESK-Antikörper gefärbt, sah man Immunreaktivität des Antikörpers nicht nur im Zellkörper der DRG-Neurone, sondern auch in den axonalen Ausläufern der Zelle (Abb. 9, C und D, Pfeile). Aufgrund dieses Expressionsmusters kann man davon ausgehen, dass der TRESK-Kanal eine wichtige sensorische Rolle in der Peripherie spielt.

Um die Ko-Expression von TRESK-Kanälen mit exzitatorischen Kanälen (z.B. TRPV1 und/oder TRPA1) auf Protein-Ebene verifizieren zu können, wurden Doppelfärbungen mit einem käuflich erworbenen TRPV1-Antikörper und dem neu entwickelten TRESK-Antikörper durchgeführt. Aufnahmen an einem konfokalen Mikroskop zeigten eine eindeutige Ko-Lokalisation beider Ionenkanäle sowohl im Zellsoma als auch in den Axonen der selben Zellen (Abb. 9, B, C und D, Pfeile).

Diese Versuche machten deutlich, dass der TRESK-Kanal nicht nur auf RNA-Ebene zusammen mit TRP-Kanälen vorkommt, wie durch die RT-PCR Versuche gezeigt, sondern, dass auch das Protein des TRESK-Kanals mit dem TRPV1-Rezeptor in DRG-Neuronen ko-exprimiert vorliegt.

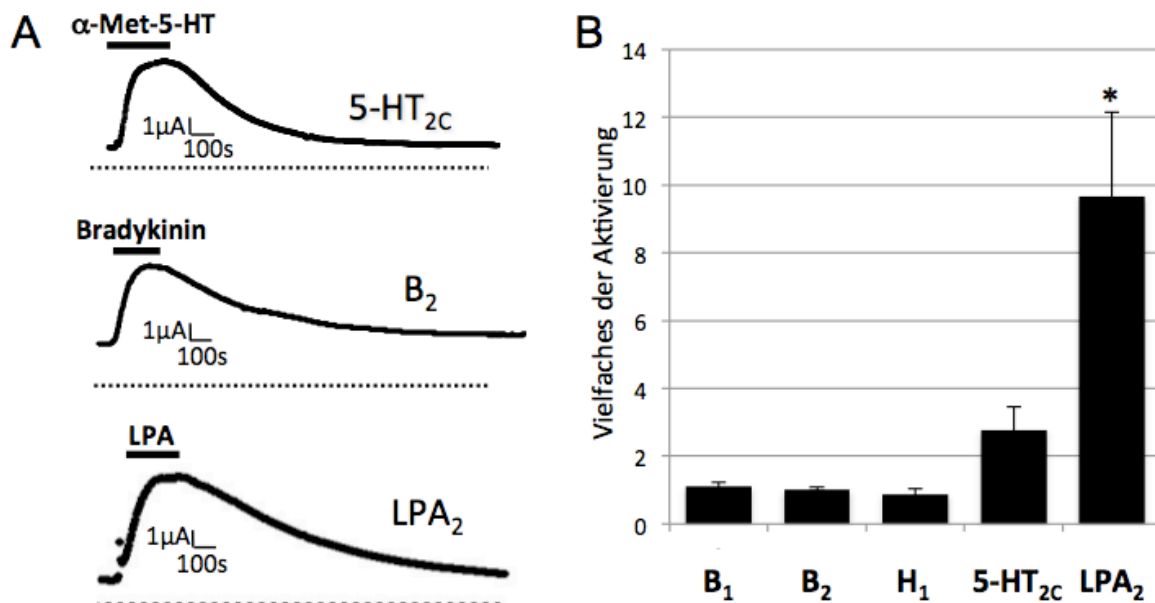
## 2. Aktivierung von TRESK durch Gq-gekoppelte Rezeptoren

Die Expression von TRESK-Kanälen in Spinalganglien weist darauf hin, dass TRESK bei der Nozizeption für die zelluläre Erregbarkeit eine Rolle spielen könnte (s. V.1; Marsh et al., 2012). Um diese Rolle genauer erklären zu können, wurde die Regulation von TRESK durch Gq<sub>11</sub>-Protein gekoppelte Rezeptoren untersucht.

Die Rezeptoren wurden zusammen mit dem TRESK-Kanal in *Xenopus* Oozyten exprimiert und anschließend mittels der TEVC elektrophysiologisch untersucht. Als Messprotokoll wurden hier Maju-Messungen verwendet (s. IV.7.1, Abb. 6, B, oben). Ausgehend von einem Haltepotenzial von -60 mV erfolgten im Abstand von 3 s Sprünge auf ein Potenzial von +30 mV für je 200 ms.

Exemplarisch sind in Abbildung 10 A Messkurven der TRESK-Aktivierung durch 5HT<sub>2C</sub>-, B<sub>2</sub>- und LPA<sub>2</sub>-Rezeptoren gezeigt. Nach Zugabe des entsprechenden Agonisten des Rezeptors konnte in jedem Beispiel eine Erhöhung des TRESK-Stroms durch die Aktivierung des Rezeptors festgestellt werden (Abb. 10, A). Für die Aktivierung des Serotonin-Rezeptors 5-HT<sub>2C</sub> wurde 2,5 nM  $\alpha$ -Met-5-HT eingesetzt, für B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> 100 nM Bradykinin, für H<sub>1</sub> 100 nM Histamin und für LPA<sub>2</sub> 0,5  $\mu$ M LPA. Die Konzentrationen der Agonisten wurden so gewählt, dass eine maximale Aktivierung des TRESK-Kanals erzielt werden konnte.

In Abbildung 10 B ist die Aktivierung von TRESK durch die verschiedenen Rezeptoren in einem Balkendiagramm quantitativ zusammengefasst. Unter den klassischen Entzündungsmediatoren führte die Aktivierung von 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptoren durch 2,5 nM  $\alpha$ -Met-5-HT zur stärksten TRESK-Aktivierung ( $2,77 \pm 0,69$ -fache; n=9). Danach folgten B<sub>1</sub>-Rezeptoren mit einer  $1,1 \pm 0,12$ -fachen Aktivierung (n=6) und B<sub>2</sub>-Rezeptoren mit einer  $1,02 \pm 0,06$ -fachen Aktivierung (n=8) des TRESK-Stroms. Histamin erhöhte den TRESK-Strom weniger stark im Vergleich zu den anderen Substanzen und zwar um das  $0,88 \pm 0,17$ -fache (n=12).



**Abb. 10: Aktivierung von Gq/11-gekoppelten Rezeptoren erhöhen den TRESK-Strom.**

(A) Repräsentative Messungen von Oozyten, die TRESK und GPCR ko-exprimierten. Bei Membranpotenzialsprüngen auf +30 mV wurde der entsprechende Agonist hinzugegeben (2,5 nM  $\alpha$ -Met-5-HT, 100 nM Bradykinin und 0,5  $\mu$ M LPA), das zu einem reversiblen Anstieg des TRESK-Stromes führte. (B) Die Messungen wurden zusammengefasst in einem Balkendiagramm dargestellt. Ko-Expression von 5-HT<sub>2C</sub>-, B<sub>1</sub>-, B<sub>2</sub>-, H<sub>1</sub>- und LPA<sub>2</sub>-Rezeptoren zusammen mit TRESK erhöhten den Kaliumstrom durch die Aktivierung mit den entsprechenden Agonisten. Im Vergleich war LPA der stärkste Aktivator der TRESK-Ströme.

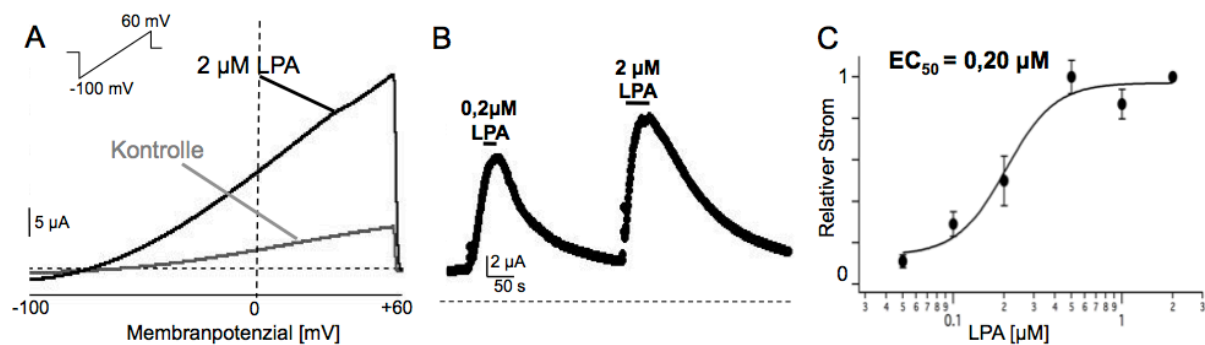
Neben den klassischen Entzündungsmediatoren wie Bradykinin, Histamin und Serotonin werden auch Phospholipide wie LPA während einer Entzündung ausgeschüttet und können die Aktivität verschiedener Ionenkanäle beeinflussen, die bei der Nozizeption eine Rolle spielen (Cohen et al., 2009; Nieto-Posadas et al., 2011). Bei der Ko-Expression von LPA<sub>2</sub>-Rezeptor, der exemplarisch als Gq-gekoppelter LPA-Rezeptor verwendet wurde, und TRESK-Kanälen erhöhte sich der basale Kaliumstrom um das  $9,67 \pm 2,48$ -fache nach der Aktivierung der Rezeptoren durch LPA (n=8; p<0,05 im Vergleich mit den anderen GPCR). Diese Erhöhung des TRESK-Stromes durch die Aktivierung des LPA-Rezeptors war mit Abstand die effektivste Stromaktivierung im Vergleich mit den klassischen Entzündungsmediatoren.

Da der Signalweg des Phospholipids LPA noch nicht sehr ausführlich erforscht ist und auch Zielstrukturen der Rezeptoraktivierung noch nicht besonders detailliert beschrieben sind (zusammengefasst in Noguchi et al., 2009) wurde im Folgenden der Einfluss von LPA-Rezeptoren auf den TRESK-Kanal und die Auswirkungen auf die Erregbarkeit genauer untersucht.

### 3. Regulation von TRESK durch LPA-Rezeptoren

Für die Untersuchung der Kopplung von LPA-Rezeptoren an TRESK eignen sich *Xenopus* Oozyten besonders gut, weil Kimura und Kollegen 2001 zwei *Xenopus* Homologe des Säuger-LPA-Rezeptors, XLPA<sub>1-1</sub> und XLPA<sub>1-2</sub>, identifizierten (Kimura et al., 2001). Beide sind funktionelle LPA-Rezeptoren und weisen eine hohe Aminosäuresequenz-Identität von 89-90 % mit dem Säuger-LPA<sub>1</sub> auf. Da das Expressionsniveau von XLPA<sub>1-1</sub> und XLPA<sub>1-2</sub> in Oozyten besonders hoch ist, wurde in den weiteren Experimenten auf die Injektion von LPA-Rezeptoren verzichtet und die endogenen XLPA-Rezeptoren genutzt. Nach Anwendung des Messprotokolls Maju (s. IV.7.1, Abb. 6, B, oben) führten Injektionen von TRESK-cRNA alleine in *Xenopus* Oozyten insgesamt zu einer Aktivierung des Kaliumstroms um das  $6,67 \pm 1,42$ -fache (n=11) nach Zugabe von 2  $\mu$ M LPA im Vergleich zum Basalstrom.

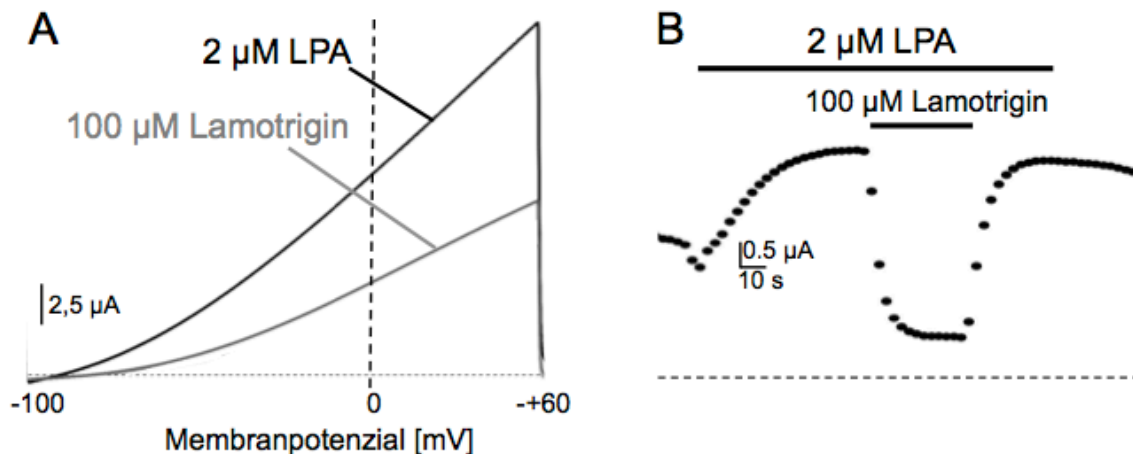
Die Injektion von TRESK-cRNA in *Xenopus* Oozyten führte zu einer deutlichen Erhöhung des Kaliumauswärtsstromes. Die Strom-Spannungs-Beziehung, die durch Spannungsrampen von -100 bis +60 mV dargestellt wurde, zeigte eine drastische Erhöhung des auswärtsgerichteten TRESK-Stromes in Anwesenheit von 2  $\mu$ M LPA im Vergleich zum basalen Kaliumauswärtsstrom (Abb. 11, A), der typisch für K<sub>2</sub>P-Kanäle ist. Maju-Messungen über einen längeren Zeitraum mit Sprüngen auf +30 mV zeigten ebenfalls einen deutlichen Anstieg des TRESK-Stromes bei Zugaben von 0,2 und 2  $\mu$ M LPA (Abb. 11, B). Die Höhe der TRESK-Aktivierung durch LPA war dosisabhängig. Höhere LPA-Konzentrationen führten zu einer stärkeren TRESK-Aktivierung (Abb. 11, B). Um die Dosisabhängigkeit genauer darzustellen wurde eine Dosis-Wirkungskurve mit den Konzentrationen 0,05 / 0,1 / 0,2 / 0,5 / 1 und 2  $\mu$ M LPA erstellt. Nach Angleichung an die Hill-Funktion zeigte die Dosis-Wirkungskurve von TRESK-Kanälen durch LPA bei einem Haltepotenzial von +30 mV eine halb-maximale Aktivierungskonzentration (EC<sub>50</sub>) von 0,2  $\mu$ M LPA. (Abb. 11, C).



**Abb. 11: LPA aktiviert TRESK-Kanäle in *Xenopus* Oozyten.**

TRESK-Kanäle wurden heterolog zusammen mit endogenen *Xenopus* LPA-Rezeptoren in Oozyten exprimiert. (A) Spannungsrampen von -100 bis +60 mV in Ab- und Anwesenheit von 2 μM LPA sind zu sehen. Der basale Auswärtsstrom wurde nach Zugabe von LPA stark erhöht. (B) Maju-Messungen mit Membranpotenzialsprüngen auf +30 mV während des Ein- und Auswaschens von 0,2 und 2 μM LPA zeigten einen deutlichen Anstieg des auswärts gerichteten Stromes während der LPA-Applikation. (C) Die Dosis-Wirkungskurve von LPA auf TRESK ergab einen EC<sub>50</sub>-Wert von 0,2 μM LPA.

G-Protein gekoppelte Rezeptor-Aktivierung von TRESK-Strömen kann durch den Stoff Lamotrigin blockiert werden (Kang et al., 2008). Um noch einmal nachzuweisen, dass es sich bei den in den *Xenopus* Oozyten gemessenen Ströme tatsächlich um TRESK-Ströme handelte, wurden sowohl LPA-aktivierte als auch basale TRESK Ströme mit 100 μM Lamotrigin gehemmt (Abb. 12). Der bei Spannungsrampen deutlich sichtbare auswärts-gerichtete Strom bei positiven Membranpotenzialen konnte, durch Zugabe von 100 μM Lamotrigin reduziert werden (Abb. 12, A). Bei Maju-Messungen mit Membranpotenzialsprüngen auf +30 mV wurde deutlich, dass nicht nur der LPA-induzierte Auswärtsstrom mit Lamotrigin zu 100 % (n=4) geblockt wurde, sondern auch der Basalstrom um  $12,6 \pm 5,4$  % inhibiert wird (n=4; Abb. 12, B).



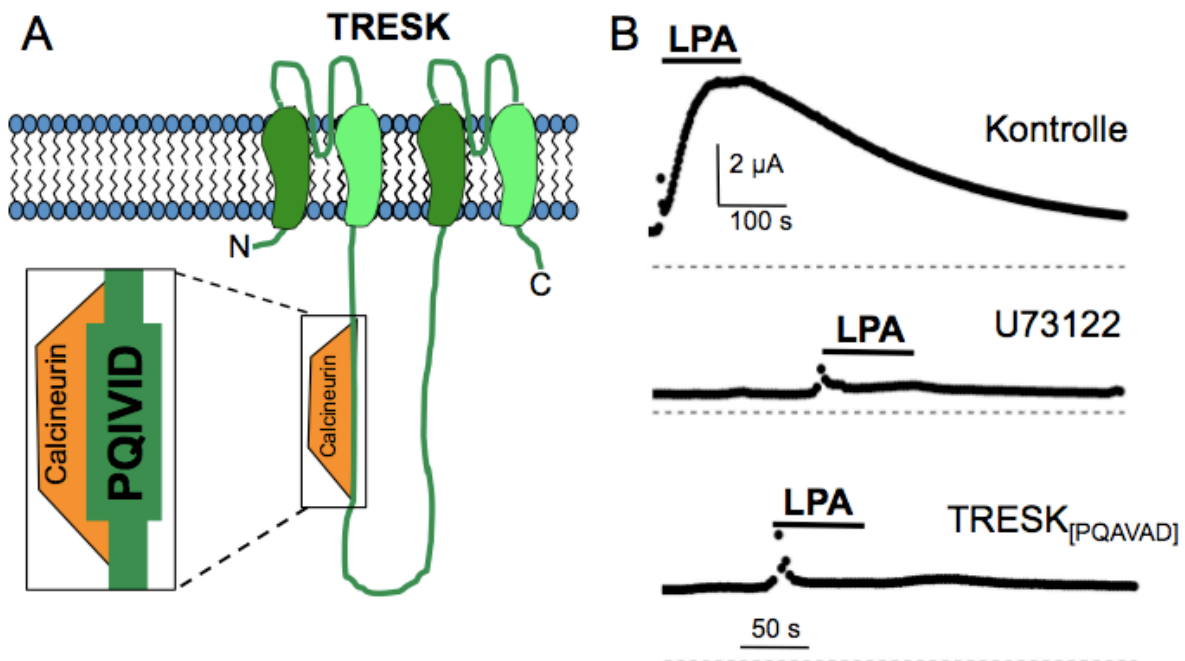
**Abb. 12: Hemmung des TRESK-Stromes durch Lamotrigin.**

(A) Der bei Spannungsrampen von -100 bis +60 mV deutliche positive Auswärtsstrom wurde durch Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Lamotrigin blockiert. (B) In Maju-Messungen mit Potenziälsprüngen auf +30 mV wurde gezeigt, dass sowohl der basale als auch der durch LPA-aktivierte TRESK Strom durch 100  $\mu\text{M}$  Lamotrigin gehemmt werden konnte.

Diese Versuche machten deutlich, dass Lamotrigin ein potenter Blocker für TRESK-Ströme ist, sodass Lamotrigin als TRESK-Strom-Inhibitor zur Identifizierung von TRESK-Strömen auch in anderen nicht-heterologen Expressionssystemen eingesetzt werden kann.

Die Aktivierung von TRESK über  $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren erfolgt über einen intrazellulären Signalweg, bei dem unter anderem die Aktivierung der PLC, Anstieg von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  sowie die Bindung von der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinphosphatase Calcineurin an den TRESK-Kanal beteiligt sind (Czirjak et al., 2004). Als funktionellen Nachweis der endogenen LPA-Rezeptoren in Oozyten und ihre Ankopplung an den Gq-Signalweg, wurde im Folgenden zum einen die PLC gehemmt und zum anderen die Bindung von Calcineurin an TRESK blockiert. Zur Hemmung der PLC wurde die *Xenopus* Oozyten vor dem Messen an der TEVC für 20 min in einer 10  $\mu\text{M}$  U73122-Lösung inkubiert. Im Vergleich mit nicht-vorbehandelten Oozyten reduzierte sich die Aktivierung des TRESK-Stromes durch

LPA nach der Behandlung mit U73122 signifikant auf nur noch das  $0,4 \pm 0,12$ -fache ( $p < 0,01$ ;  $n=6$ ; Abb. 13, B oben und Mitte).



**Abb. 13: Signalweg der  $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren und Calcineurinbindung.**

(A) Schematische Darstellung der Bindung von Calcineurin an TRESK. Die Phosphatase Calcineurin bindet an das Bindungsmotiv PQIVID in einer intrazellulären Schleife des Kanals. (B) Der LPA-induzierte Strom konnte entweder durch Inkubation mit dem PLC-Blocker U73122 (Mitte) oder durch die Mutation des Bindungsmotiv für Calcineurin (TRESK<sub>[PQAVAD]</sub>, unten) vollständig blockiert werden, wie in den drei Maju-Messungen mit Potenzialsprüngen auf +30 mV zuerkennen ist.

In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass die Aktivierung des TRESK-Stromes durch die Bindung von Calcineurin an das Bindungsmotiv PQIVID innerhalb des Kanals erfolgt (Abb. 13, A; Czirjak and Enyedi, 2006). Um die Beteiligung von Calcineurin am Signalweg im *Xenopus* Oozyten-Expressionssystem zu untersuchen, wurde das Bindungsmotiv mutiert, indem zwei Isoleucine gegen zwei Alanine ausgetauscht wurden (PQIVID → PQAVAD). Diese Mutation innerhalb des TRESK-Kanals soll die Aktivierung des Kanals durch Calcineurinbindung verhindern (Czirjak et al., 2004). Hier führte die Zugabe von 2 μM LPA zu den mutierten TRESK-Kanälen

(TRESK<sub>[PQAVAD]</sub>) zu absolut keiner Erhöhung des TRESK-Stroms im Vergleich mit den wildtypischen TRESK-Kanälen ( $p < 0,01$ ;  $n = 12$ ; Abb. 13, B, unten).

Beide Experimente zeigten, dass die endogenen LPA-Rezeptoren in *Xenopus* Oozyten an TRESK-Kanäle koppeln. Dabei ist sowohl die aktive PLC als auch die Bindung von Calcineurin an den Kanal für die Aktivierung von TRESK-Strömen notwendig.

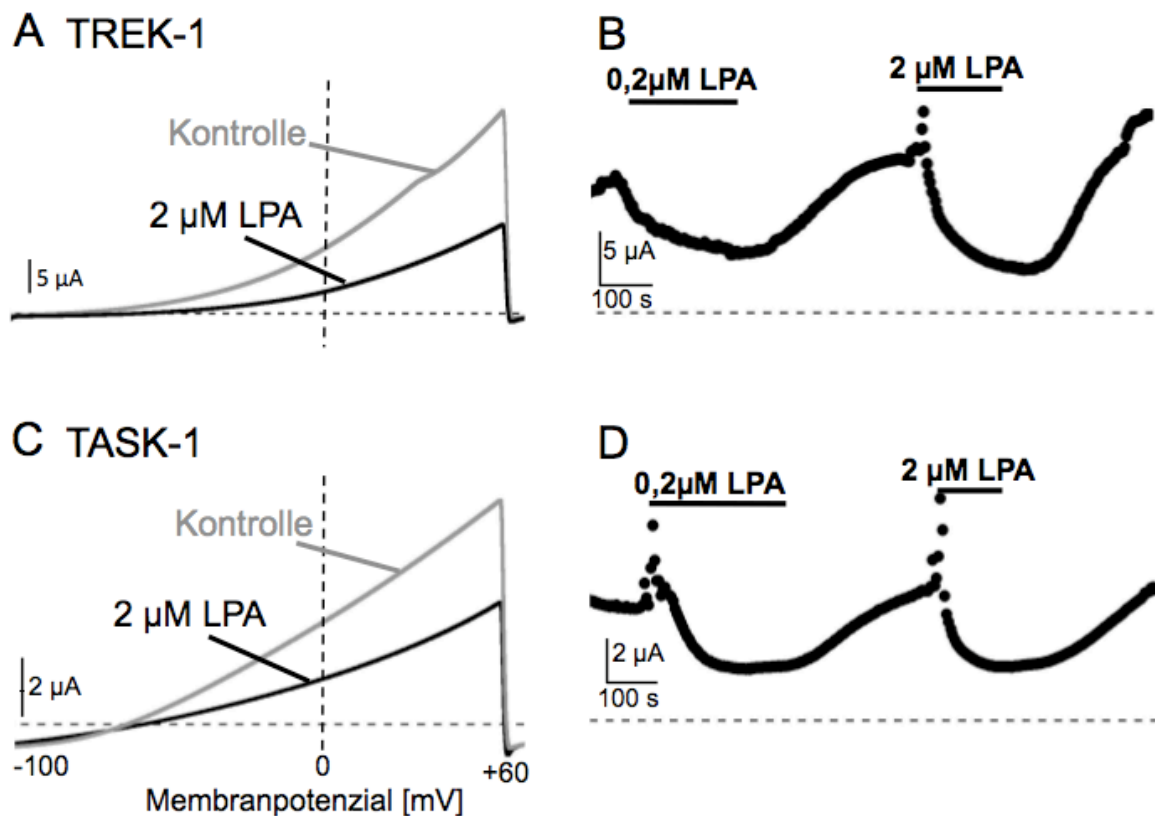
#### 4. Inhibition von TASK-1 und TREK-1 durch LPA

Viele Zellen besitzen mehrere K2P-Kanäle, daher ist es von besonderem Interesse den Einfluss von LPA auch auf andere K2P-Kanäle zu untersuchen, die ebenfalls in Spinalganglien zu finden sind. Die Kanäle TREK-1 und TASK-1 sind zwar in DRG schwächer exprimiert, aber signifikant vorhanden (Dobler et al., 2007; Kang et al., 2005; Marsh et al., 2012). Dass Substanzen wie LPA den TREK-1-Kanal beeinflussen können, wurde bereits untersucht (Cohen et al., 2009). Der Einfluss von LPA auf TASK-1 ist bisher noch nicht beschrieben.

Abbildung 14 zeigt andere K2P-Kanäle neben TRESK wie TREK-1 und TASK-1, die im Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten untersucht wurden.

Der basale Kaliumauswärtsstrom von TREK-1 konnte in den Spannungsrampen von -100 bis +60 mV durch die Applikation von 2  $\mu$ M LPA inhibiert werden (Abb. 14, A). Bei einer länger andauernden Strommessung (Maju) mit Potenziälsprüngen auf +30 mV wurde der TREK-1-Strom durch 0,2  $\mu$ M LPA um  $46,1 \pm 5,9$  % ( $p = 0,06$ ;  $n = 4$ ) und durch 2  $\mu$ M LPA um  $58,4 \pm 5,5$  % ( $p = 0,08$ ;  $n = 4$ ) inhibiert (Abb. 14, B). Diese Inhibition des Kaliumauswärtsstromes durch die Aktivierung von LPA-Rezeptoren zeigte ebenfalls der K2P-Kanal TASK-1 (Abb. 14, C und D). So zeigten die Maju-Messungen mit Membranpotenziälsprüngen auf +30 mV eine signifikante Inhibition des Kaliumauswärtsstromes von  $62,5 \pm 4,2$  % mit 0,2  $\mu$ M LPA ( $p < 0,05$ ;  $n = 4$ ) und um  $55,3 \pm 11,6$  % mit 2  $\mu$ M LPA ( $p < 0,05$ ;  $n = 4$ ; Abb. 14, D).





**Abb. 14: Einfluss von LPA auf TREK-1 und TASK-1.**

(A) Spannungsrampen von -100 bis +60 mV von TREK-1 exprimierenden *Xenopus* Oozyten. Der basale Kaliumauswärtsstrom wird durch LPA-Applikation gehemmt. (B) Auch in Maju-Messungen mit Sprüngen auf ein Potenzial von +30 mV sieht man die Strominhibition unter LPA. Diese Inhibition durch LPA-Rezeptoraktivierung zeigte ebenfalls der TASK-1-Kanal, sowohl bei den Spannungsrampen (C) als auch bei den Maju-Messungen (D).

Die Wirkung von LPA auf TREK-1 zeigte eine Dosisabhängigkeit, da mit höherer LPA-Konzentration eine stärkerer Inhibition erzielt werden konnte, wie auch in Abbildung 14 B anhand der schnellere und größerer Hemmung des TREK-1-Stromes durch die höhere LPA-Konzentration zuerkennen ist. Die Sättigungskonzentration von LPA auf TASK-1 war mit 0,2 µM anscheinend schon fast erreicht, da mit höherer Konzentration von 2 µM keine stärkere Inhibition des Kaliumauswärtsstromes erreicht werden konnte (Abb. 14, D).

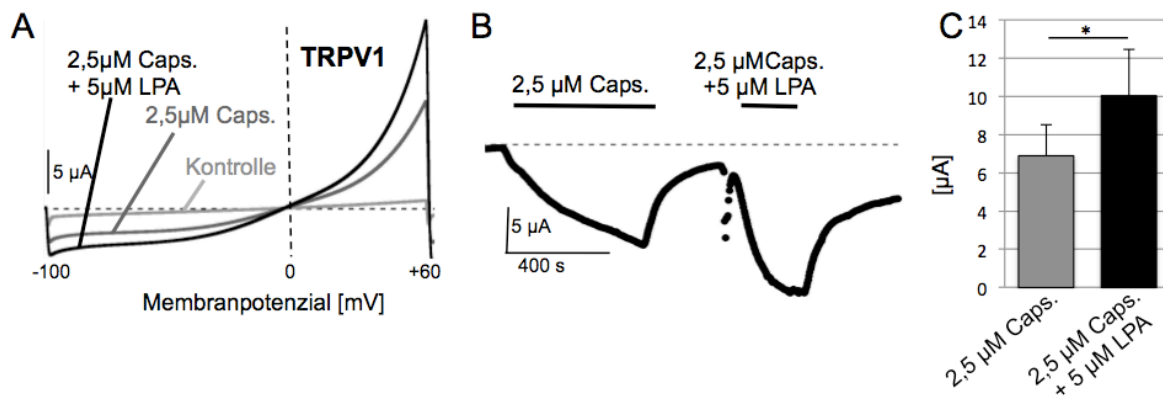
Diese Versuche zeigten, dass auch andere K2P-Kanäle, die in Spinalganglien exprimiert werden, durch LPA beeinflusst werden. Im Gegensatz zu den TRESK-Kanälen, werden TREK-1 und TASK-1 durch die Applikation von LPA inhibiert.

## 5. Ko-Regulation von TRP- und TRESK-Kanälen durch LPA

Wie die RT-PCR und Immunocytochemie-Versuche in V.1 zeigten, sind neben den K2P-Kanälen in DRG-Neuronen auch TRP-Kanäle signifikant exprimiert. Die nicht-selektiven Kationenkanäle TRPV1 und TRPA1 spielen bei der Nozizeption und vor allem bei Entzündung eine große Rolle (Caterina et al., 1997; Bautista et al., 2012). Um den Einfluss von Entzündungsmediatoren wie LPA und das Zusammenspiel der verschiedenen, in DRG-Neuronen exprimierten Kanäle genauer zu untersuchen, wurden TRPV1 und TRPA1 sowohl allein als auch zusammen mit TRESK in *Xenopus* Oozyten exprimiert.

### 5.1 Einfluss von LPA auf TRPV1

Erst vor Kurzem wurde beschrieben, dass die hitzeempfindlichen TRPV1-Kanäle durch direkte Interaktion mit LPA aktiviert werden können (Nieto-Posadas et al., 2011). Diese Interaktion wurde im *Xenopus* Oozyten Expressionssystem überprüft. Die Spannungsrampen von -100 bis +60 mV zeigten einen Anstieg des nach einwärts gerichteten Kationenstromes nach Applikation von 2,5  $\mu\text{M}$  Capsaicin. Dieser Anstieg des Einwärtsstromes konnte durch Zugabe von einer Kombination aus 2,5  $\mu\text{M}$  Capsaicin und 5  $\mu\text{M}$  LPA noch erhöht werden (Abb. 15, A). Das Umkehrpotenzial der Spannungsrampen lag bei 2 mV, das sehr Nahe am berechneten Nernst-Potenzial für nicht-selektive Kationenkanäle ist (0 mV). Das gleiche Verhalten der Stromaktivierung konnte auch bei Maju-Messungen mit Membranpotenzialsprüngen auf -80 mV gesehen werden (Abb. 15, B). Die Applikation von LPA führte hierbei zu einer schnelleren und stärkeren Aktivierung des Einwärtsstromes. Die Deaktivierung des Stromes zeigte keine Veränderung (Abb. 15, B). Insgesamt führte die TRPV1-Expression in *Xenopus* Oozyten zu einer robusten Aktivierung der Einwärtsströme auf  $6,89 \pm 1,64 \mu\text{A}$  nach Zugabe von 2,5  $\mu\text{M}$  Capsaicin. Bei Ko-Applikation von 2,5  $\mu\text{M}$  Capsaicin und 5  $\mu\text{M}$  LPA erhöhte sich der Einwärtsstrom signifikant auf  $10,3 \pm 2,4 \mu\text{A}$  ( $p < 0,05$ ;  $n=4$ ; Abb. 15, C).



**Abb. 15: LPA aktiviert TRPV1-Ströme in *Xenopus* Oozyten.**

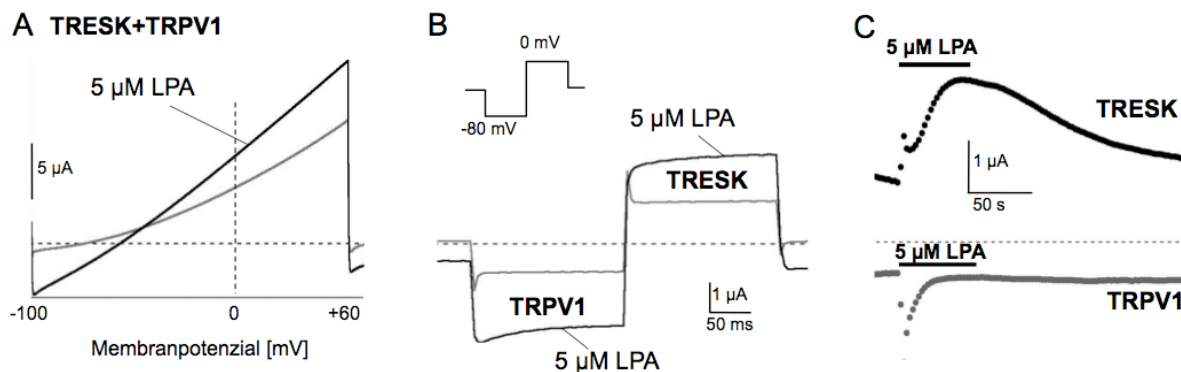
TRPV1-Kanäle wurden heterolog zusammen mit endogenen *Xenopus* LPA-Rezeptoren in Oozyten exprimiert. (A) Spannungsrampen von -100 bis +60 mV sind zu sehen. Der einwärts gerichtete Basalstrom wurde nach Zugabe von 2,5 µM Capsaicin erhöht. Diese Erhöhung des Stromes konnte durch 5 µM LPA noch gesteigert werden. (B) Maju-Messungen mit Membranpotenzialsprüngen auf -80 mV während der Zugabe von 2,5 µM Capsaicin und 5 µM LPA sind abgebildet. Die Applikation von Capsaicin und LPA führte zu einem Anstieg des einwärtsgerichteten Stromes. (C) Die Messwerte wurden zusammenfassend in einem Balkendiagramm dargestellt.

Diese Versuche zeigten den aktivierenden Effekt von LPA auf TRPV1. Außerdem wurde hier deutlich, dass die Aktivierung von TRPV1 durch LPA, im Vergleich mit dem TRPV1-Agonisten Capsaicin alleine, signifikant stärker war.

## 5.2 Ko-Expression von TRPV1 und TRESK

Da TRESK-Kanäle und TRPV1-Rezeptoren beide durch LPA aktiviert werden können, wurde als nächstes der Effekt von LPA in Oozyten untersucht, die gleichzeitig sowohl TRPV1 als auch TRESK exprimierten. Die Spannungsrampen vom -100 bis +60 mV zeigten einen Anstieg sowohl des Auswärts- also auch des Einwärtsstromes nach Zugabe von 5 µM LPA. Das Umkehrpotenzial verschob sich von anfänglich  $-81,4 \pm 2,7$  mV auf  $-55,6 \pm 4,06$  mV ( $n=5$ ; Abb. 16, A). Dieser Wert lag zwischen den Umkehrpotenzialen der beiden beteiligten Kanäle (für TRESK bei -80 mV, für TRPV1 bei 0 mV). Nach Auswaschen des LPAs sanken beide Ströme wieder auf ihren Ausgangswert. Um TRESK- und TRPV1-Ströme unabhängig voneinander in derselben Zelle messen zu können, wurde ein spezielles Pulsprotokoll angewendet (s. IV.7.1; Abb. 6, C). Alternierende Sprünge zu den beiden

Umkehrpotenzialen von TRESK (-80 mV) und TRPV1 (0 mV) erlaubte die selektive Aufnahme der TRPV1-Ströme bei -80 mV und die der TRESK-Ströme bei 0 mV. Bei -80 mV führte die Applikation von 5  $\mu$ M LPA zu einem  $83 \pm 20\%$ igen signifikanten Anstieg des Einwärtsstromes ( $p < 0,01$ ;  $n=14$ ; Abb. 16, B) und gleichzeitig erhöhte sich der TRESK-Auswärtsstrom bei 0 mV signifikant um  $69 \pm 15\%$  ( $p < 0,01$ ;  $n=14$ ; Abb. 16, B und C). Auffällig war hier die deutliche Deaktivierung der TRPV1-Antwort auf LPA nach nur wenigen Sekunden (Abb. 16, C). Die Ursache hierfür konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.



**Abb. 16: TRPV1 und TRESK werden durch LPA gleichzeitig aktiviert.**

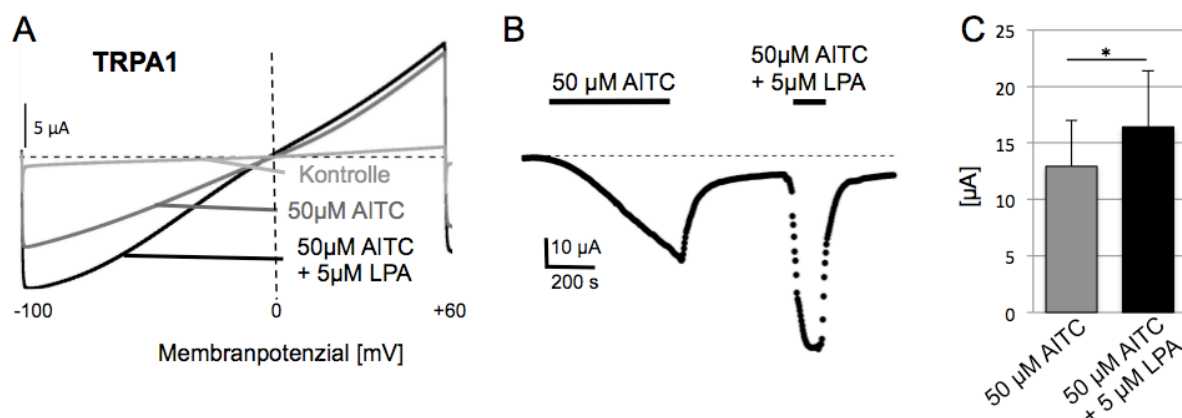
TRPV1 und TRESK wurden heterolog in derselben *Xenopus* Oozyte exprimiert. (A) TRPV1 und TRESK ko-exprimierende Oozyten zeigten einen Anstieg des Einwärts- sowie des Auswärtsstromes nach Zugabe von 5  $\mu$ M LPA bei Spannungsrampen von -100 bis +60 mV. (B) Das Pulsprotokoll zu den jeweiligen Umkehrpotenzialen (-80 und 0 mV) zeigte eine zeitgleiche Ko-Aktivierung von TRPV1- und TRESK-Kanälen durch LPA in derselben Oozyte. (C) LPA-induzierte Aktivierung von TRESK- und TRPV1-Strömen in einem größeren Zeitfenster ist abgebildet. Die schnelle Deaktivierung des TRPV1-Stromes nach Zugabe von LPA ist zu erkennen.

Im Prinzip konnte durch diese Experimente im heterologen Expressionssystem gezeigt werden, dass die LPA-induzierte Ko-Aktivierung von TRPV1 und TRESK zu einer Begrenzung des exzitatorischen Effekts während einer Entzündungsreaktion, hier durch die Zugabe von LPA dargestellt, führen kann.

### 5.3 Einfluss von LPA auf TRPA1

Wie Bautista und Kollegen in ihrem Review ausführlich beschreiben, spielt der nicht-selektive Kationenkanal TRPA1 bei Entzündung eine entscheidende Rolle, sowohl

als Detektor als auch als Initiator für Entzündungsreaktionen (Bautista et al., 2012). Außerdem ist er ebenfalls in DRG-Neuronen zu finden (s. V.1.1; Abb. 8, A). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde TRPA1 in dieser Arbeit genauer untersucht, um festzustellen, ob dieser Kanal ähnlich wie TRPV1 auch zu dem balancierten System der entgegengesetzten Ströme, die durch Entzündungstoffe aktiviert werden, beiträgt.



**Abb. 17: LPA aktiviert TRPA1-Ströme in *Xenopus* Oozyten.**

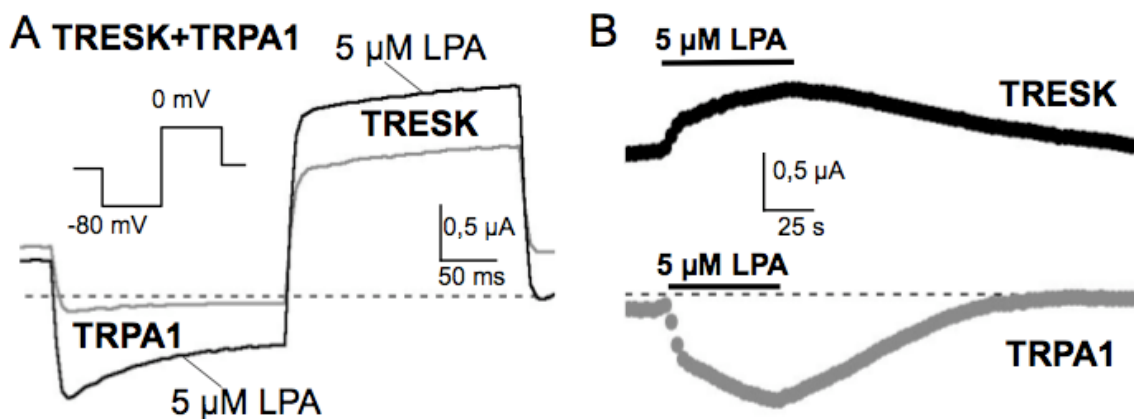
TRPA1-Kanäle wurden heterolog zusammen mit endogenen *Xenopus* LPA-Rezeptoren in Oozyten exprimiert. (A) Zugabe von 50 µM AITC vergrößerte den Basalstrom und konnte durch Ko-Applikation von 5 µM LPA und 50 µM AITC nochmals gesteigert werden (Spannungsrampen von -100 bis +60 mV). (B) In Maju-Messungen mit Potenzialsprüngen auf -80 mV während der Zugabe von 50 µM AITC und 5 µM LPA war der Anstieg des einwärts gerichteten Stromes während der Ko-Applikation deutlich sichtbar. (C) Die Messwerte wurden zusammenfassend in einem Balkendiagramm dargestellt.

Zunächst wurde die Frage geklärt, ob LPA auch TRPA1-Rezeptoren beeinflussen kann. Wurde TRPA1 allein in *Xenopus* Oozyten exprimiert, zeigten die Spannungsrampen von -100 bis +60 mV einen Anstieg des Einwärts-Kationen-Stromes nach der Zugabe von 50 µM AITC. Erhöht wurde dieser einwärts gerichtete Strom nach Applikation von 50 µM AITC in Kombination mit 5 µM LPA (Abb. 17, A). Die gleiche Stromaktivierung konnte auch bei kontinuierlichen Messungen bei einem Haltepotenzial von -80 mV gesehen werden (Abb. 17, B). Wie in Abbildung 17 B deutlich zu erkennen ist, war die Aktivierung des einwärtsgerichteten Stromes bei der Applikation mit LPA deutlich schneller. Der Einwärtsstrom von TRPA1

exprimierenden *Xenopus* Oozyten stieg insgesamt auf  $12,9 \pm 4 \mu\text{A}$  nach Zugabe von  $50 \mu\text{M}$  AITC. Bei Ko-Applikation von  $50 \mu\text{M}$  AITC und  $5 \mu\text{M}$  LPA erhöhte sich der Einwärtsstrom signifikant auf  $16,4 \pm 5 \mu\text{A}$  ( $p < 0,05$ ;  $n=7$ ; Abb. 17, C). Diese Versuche zeigten zum ersten Mal, dass TRPA1-Rezeptoren durch LPA-Applikation aktiviert werden können.

#### 5.4 Ko-Expression von TRPA1 und TRESK

Wie oben gezeigt können nicht nur TRESK- und TRPV1-Kanäle durch LPA aktiviert werden, sondern auch TRPA1-Rezeptoren. Als nächstes wurde der Einfluss von LPA auf *Xenopus* Oozyten untersucht, in die sowohl TRPA1 als auch TRESK injiziert wurde.



**Abb. 18: TRPA1 und TRESK werden simultan durch LPA aktiviert.**

TRPA1 und TRESK wurden heterolog in derselben *Xenopus* Oozyte zeitgleich exprimiert. (A) Das Maju-Pulsprotokoll zu den jeweiligen Umkehrpotenzialen (-80 und 0 mV) zeigte eine zeitgleiche Ko-Aktivierung von TRPA1- und TRESK-Kanälen durch LPA in der selben Oozyte. (B) Die LPA induzierte Aktivierung von TRESK- und TRPA1-Strömen in einem größeren Zeitfenster ist abgebildet. Der hyperpolarisierende TRESK-Strom wirkte dem depolarisierenden TRPA1-Strom entgegen.

Auch hier wurde das schon oben erwähnte Pulsprotokoll angewendet, das erlaubte TRESK-Ströme bei 0 mV und TRPA1 bei -80 mV separat in der gleichen Zelle zu messen. Wie auch schon bei der Ko-Expression von TRPV1 und TRESK, führte die Applikation von  $5 \mu\text{M}$  LPA bei -80 mV zu einem Anstieg des TRPA1-Einwärtsstromes

(Abb. 18, A) und gleichzeitig erhöhte sich der TRESK-Auswärtsstrom bei 0 mV (Abb. 18, A und B). Anders als bei der TRPV1/TRESK-Ko-Expression war bei der Ko-Expression mit TRPA1 keine schnelle Deaktivierung des Einwärtsstromes zu erkennen (Abb. 18, B).

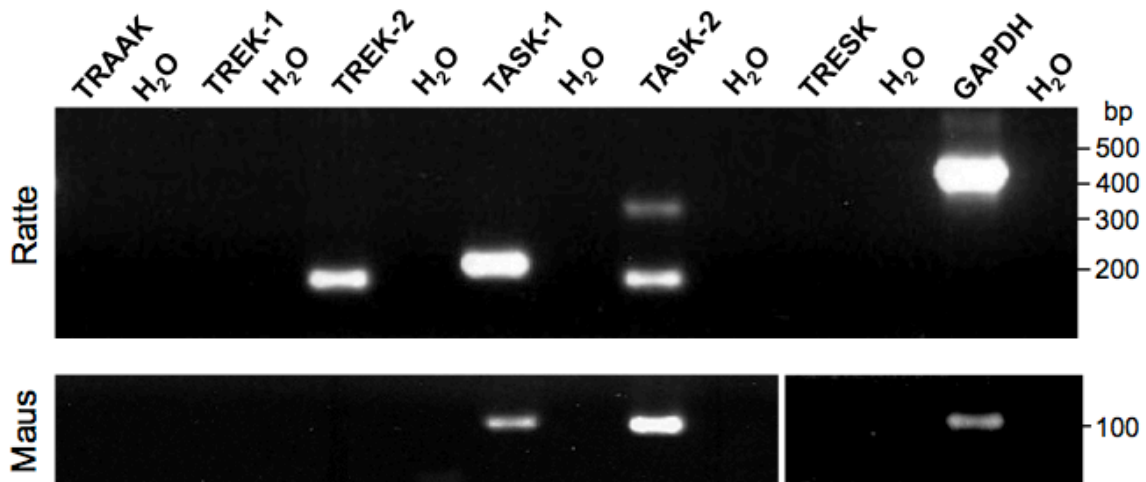
Durch die Applikation von LPA wurden beide in derselben Oozyte exprimierten Kanäle, TRESK und TRPA1, aktiviert. Der dadurch ausgelöste depolarisierende Kationenstrom durch TRPA1 wurde durch den gleichzeitig aktivierten hyperpolarisierenden Kaliumstrom durch TRESK in seiner Wirkung antagonisiert.

## **6. Steuerung der Erregbarkeit von F-11 Zellen durch TRESK-Kanäle**

### **6.1 Expressionsprofil von K2P-Kanälen in F-11 Zellen**

Die F-11 Zelllinie wurde von DRG-Neuronen der Ratte und Glioblastomazellen der Maus abgeleitet (Platika et al., 1985). Um einen Eindruck von der Ähnlichkeit bezüglich der Kaliumhintergrundströme zu nativen DRG-Neuronen zu gewinnen, wurde ein Expressionsprofil von K2P-Kanälen in F-11 Zellen erstellt.

In nativen DRG-Neuronen ist TRESK der am stärksten exprimierte K2P-Kanal (Dobler et al., 2007), danach folgen in absteigender Reihenfolge TRAAK, TREK-2/TWIK-2, TREK-1, TASK-1, TASK-2, THIK-1 und TASK-3 (Marsh et al., 2012). Abbildung 19 zeigt das Expressionsprofil der sechs in DRG am stärksten exprimierten K2P-Kanäle in F-11 Zellen unter der Verwendung intronübergreifender Primer der Spezies Ratte und Maus (s. III.2.1) in der RT-PCR. Nach der Auftrennung im 2 % Agarosegel konnte im Anschluss an die RT-PCR die Existenz der Hintergrundkanäle TREK-2, TASK-1 und TASK-2 nachgewiesen werden, während TRAAK, TREK-1 und TRESK nicht vorhanden waren. Um die Primerpaare für TRAAK, TREK-1 und TRESK zu überprüfen, wurden für diese Kanäle Positivkontrollen mit Plasmid-DNA der entsprechenden Kanäle durchgeführt. Diese Kontrollen waren für alle drei Primerpaare positiv (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 19: Expressionsprofil von K2P-Kanälen in F-11 Zellen.**

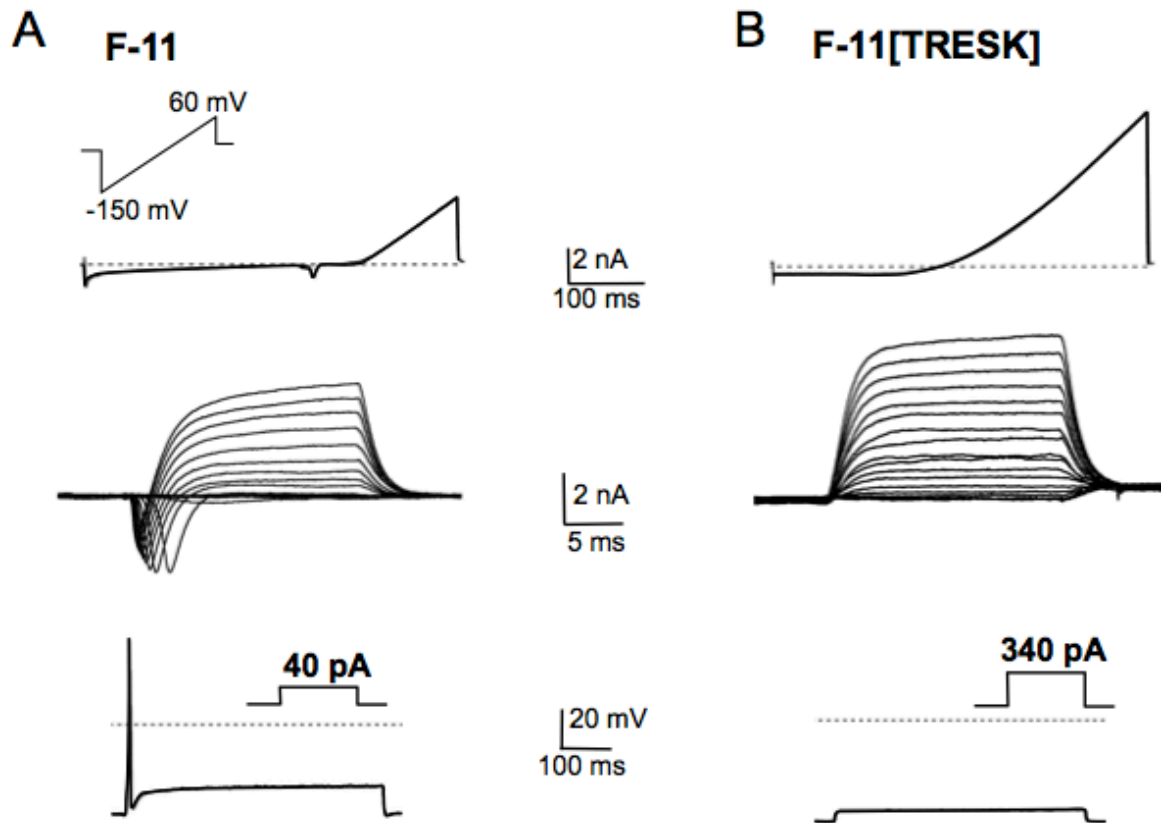
Es wurde cDNA aus der gesamten RNA von F-11 Zellen erstellt. Diese cDNA wurde für RT-PCR mit intronübergreifenden Primern benutzt. Die K2P-Kanäle TREK-2, TASK-1 und TASK-2 konnten in der Zelllinie F-11 nachgewiesen werden. TRAAK, TREK-1 und TRESK konnten nicht detektiert werden. Als Positivkontrolle wurde GAPDH verwendet. Zu jedem Primerpaar wurden Negativkontrollen mit H<sub>2</sub>O durchgeführt. Zu TRAAK, TREK-1 und TRESK wurden zusätzlich Positivkontrollen mit Plasmid-DNA der entsprechenden Kanäle durchgeführt. Alle Kontrollen waren positiv.

Aufgrund der starken Expression von TRESK-Kanälen in nativen DRG-Neuronen und der Abwesenheit von TRESK-Kanälen in F-11 Zellen, ist diese Zelllinie ein geeignetes System, um den Einfluss von TRESK-Strömen auf die Erregbarkeit neuronaler Zellen zu untersuchen.

## 6.2 Einfluss der heterologen Expression von TRESK in F-11 Zellen

In der Zelllinie F-11 werden verschiedenen Ionenkanäle exprimiert, wie z.B. spannungsgesteuerte HERG K<sup>+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Kanäle (Chiesa et al., 1997), Ca<sup>2+</sup>-aktivierte K<sup>+</sup>-Kanäle (Naruse et al., 1992) und auch temperatursensitive TRPV2-Kanäle (Bender et al., 2005). Aufgrund der Expression dieser verschiedenen Kanäle können F-11 Zellen erregt werden und sind in der Lage Aktionspotenziale zu generieren.





**Abb. 20: Transfektion von F-11 Zellen mit TRESK verringert die zelluläre Erregbarkeit.**

(A) Nicht-transfizierte F-11 Zellen zeigten typische spannungsgesteuerte  $K^+$ - und  $Na^+$ -Ströme in Spannungsrampen (oben) sowie bei depolarisierenden Spannungssprüngen ( $IV_{Na}$ ; Mitte). Stromapplikation von 40 pA führte zu einzelnen Aktionspotentialen (unten). (B) In TRESK transfizierten F-11 Zellen vergrößerten sich die Auswärtsströme mit einer Verschiebung des Umkehrpotenzials in negative Richtung bei Spannungsrampen von -150 bis +60 mV (oben). Außerdem gab es den Verlust von spannungsgesteuerten Natriumkanälen in depolarisierenden Spannungssprüngen (Mitte). Selbst eine Strominjektion von 340 pA führte zu keinen Aktionspotentialen (unten).

Spannungsrampen von -150 bis +60 mV zeigten in nicht-transfizierten F-11 Zellen typische spannungsgesteuerte auswärtsgerichtete Ströme bei positiven Membranpotenzialen und auch spannungsgesteuerte einwärtsgerichtete Ströme waren angedeutet (Abb. 20, A, oben). Besonders deutlich sah man die typischen Ströme durch spannungsgesteuerte  $K^+$ - und  $Na^+$ -Kanäle bei depolarisierenden Pulsen von -100 mV bis +70 mV nach einer Hyperpolarisierung auf -80 mV ( $IV_{Na}$ ;

Abb. 20, A, Mitte). Im Strom-Klemme-Modus konnten durch depolarisierende Pulse von 40 pA einzelne Aktionspotenziale ausgelöst werden (n=10; Abb. 20, A, unten).

Nach heterologer Überexpression von TRESK-Kanälen in F-11 Zellen zeigten die Spannungsrampen eine starke Erhöhung des auswärtsgerichteten Stromes, die in nicht-transfizierten F-11 Zellen angedeuteten einwärtsgerichteten Ströme waren nicht mehr zu erkennen (Abb. 20, B, oben). Außerdem konnte in TRESK-transfizierten F-11 Zellen eine Verschiebung des Umkehrpotenzials in negative Richtung festgestellt werden (Abb. 20, B, oben). Depolarisierende Pulse ( $I_{V_{Na}}$ ) führten zu stark erhöhten Kaliumauswärtsströmen sowie den Verlust von spannungsgesteuerten  $Na^+$ -Kanälen (Abb. 20, B, Mitte). In TRESK-transfizierten F-11 Zellen konnten durch Strominjektion im Strom-Klemme-Modus keine Aktionspotenziale erzeugt werden, auch nicht bei Pulsen von bis zu 340 pA (n=10; Abb. 20, B, unten).

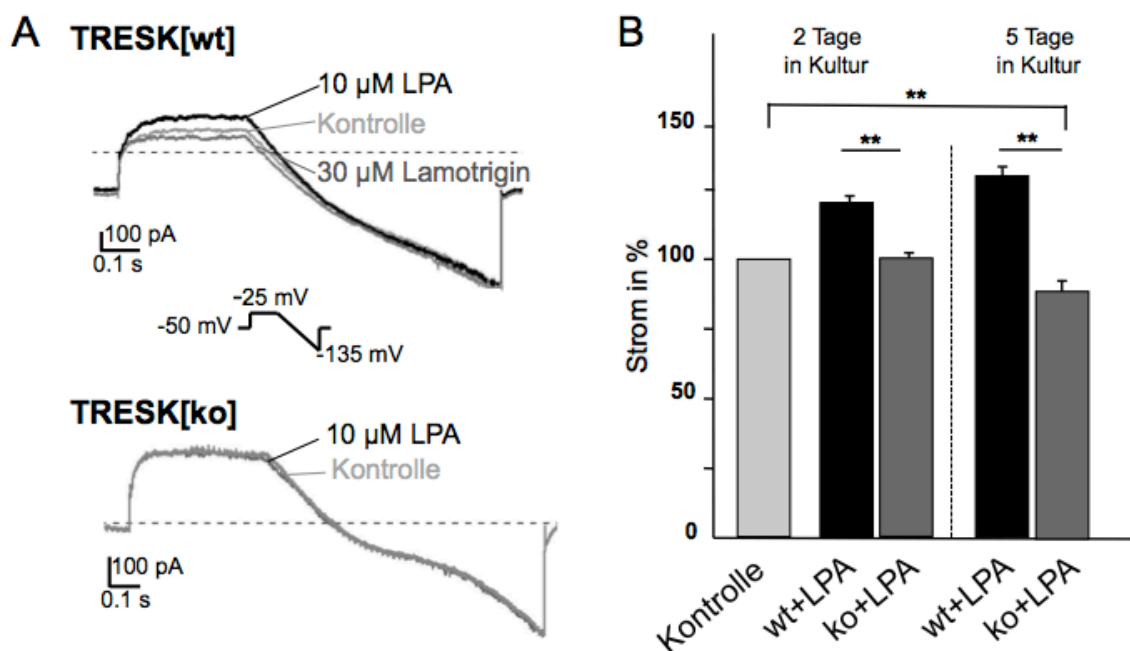
So führte die Überexpression von TRESK-Kanälen zu einem totalen Verlust der Erregbarkeit in F-11 Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass die Größe von Kaliumhintergrundströmen einen wesentlichen Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit hat.

## **7. Regulation der Erregbarkeit in primären DRG-Neuronen durch TRESK-Kanäle**

Der Einfluss von LPA auf TRESK-Kanäle wurde in heterologen Expressionssystemen (*Xenopus* Oozyten und F-11 Zellen) aufgezeigt. In den folgenden Versuchen sollte dieser Effekt in primären DRG-Neuronenkulturen von Mäusen verifiziert werden. Um den Einfluss der stark in DRG exprimierten TRESK-Kanäle auf die Erregbarkeit der DRG-Neurone zu untersuchen, wurden Primärkulturen von murinen DRG-Neuronen angelegt. Hierbei wurden stets Spinalganglien von wildtypischen C3H Mäusen als auch von funktionellen TRESK[ko]-Mäusen kultiviert. Diese neuronalen Primärzellen wurden in der Patch-Clamp Technik im Ganzzell-Modus elektrophysiologisch untersucht.

## 7.1 Aktivierung des $I_{K_{SO}}$ durch LPA in DRG-Neuronen

Frühere Untersuchungen an kultivierten DRG-Neuronen zeigten, dass ungefähr 25 % des  $I_{K_{SO}}$  den TRESK-Kanälen zuzuschreiben ist (Dobler et al., 2007). Um die Regulation von TRESK und depolarisierenden Strömen, wie z.B. TRPV1-Ströme, in nativen DRG-Neuronen genauer zu betrachten, wurde der elektrophysiologische Effekt von LPA auf DRG-Neurone sowohl in der Spannungsklemme als auch im Strom-Klemme-Modus untersucht.



**Abb. 21: LPA-Rezeptoren aktivieren  $I_{K_{SO}}$ -Ströme in DRG-Neuronen.**

(A) Ganzzellableitungen von TRESK[wt]-Neuronen zeigten einen Anstieg des  $I_{K_{SO}}$ -Stromes nach Zugabe von 10  $\mu$ M LPA, der durch 30  $\mu$ M Lamotrigin wieder inhibiert werden konnte (oben). In TRESK[ko]-Neuronen führte die Applikation von 10  $\mu$ M LPA zu keinem Effekt (unten). (B) Das Balkendiagramm zeigt zusammengefasst die Daten von (A) (junge Neurone, 2 Tage in Kultur) und älteren Neuronen (5 Tage in Kultur).

Zunächst wurden junge Neurone verwendet, die erst für 2-3 Tage in Kultur waren und nur sehr kurze axonale Ausläufer aufwiesen, um Klemmartefakte zu vermeiden. Um den  $I_{K_{SO}}$  messen zu können, wurde das Pulsprotokoll einer inversen Rampe benutzt (Abb. 7, C; Abb. 21, A, schematische Darstellung des Pulsprotokolls). Diese inverse Rampe erlaubte am Ende des depolarisierenden Schrittes (bei -25 mV) den

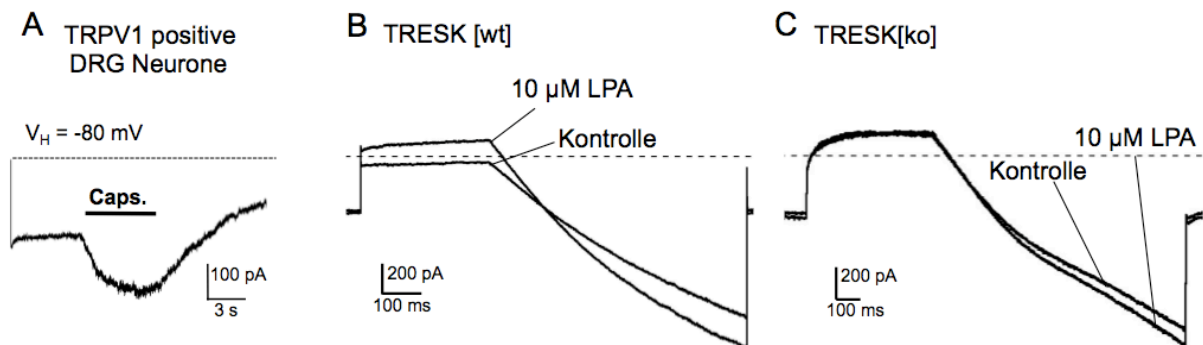
$I_{K_{SO}}$  zu messen. Die  $I_{K_{SO}}$ -Ströme von DRG-Neuronen von wildtypischen C3H Mäusen (TRESK[wt]) zeigten einen Anstieg von 492,3 auf 567,6 nA ( $19,8 \pm 2,9 \%$ ;  $p < 0,01$ ;  $n=11$ ) nach Zugabe von 10  $\mu$ M LPA. Diese LPA-induzierte Aktivierung konnte durch 30  $\mu$ M Lamotrigin wieder vollständig aufgehoben werden (Abb. 21, A, oben). Um den aktivierten und reversiblen  $I_{K_{SO}}$ -Strom eindeutig dem TRESK-Strom zuordnen zu können, wurden auch DRG-Neurone der funktionellen TRESK[G339R] ko-Maus (TRESK[ko]; Dobler et al., 2007) analysiert. Da die kultivierten TRESK[ko]-Neurone keine Veränderung des  $I_{K_{SO}}$  nach Applikation von 10  $\mu$ M LPA zeigten (437,2 nA zu 442,8 nA;  $n=12$ ; Abb. 21, A, unten), war der LPA sensitive Anteil des  $I_{K_{SO}}$  in TRESK[wt]-Neuronen dem TRESK-Kanal zu zuschreiben.

Bei älteren DRG-Neuronen, die schon 5-7 Tage in Kultur waren und deutliche axonale Ausläufer hatten, war der Unterschied im  $I_{K_{SO}}$  noch deutlicher. So zeigten TRESK[wt]-Neurone einen Anstieg des  $I_{K_{SO}}$  um  $28 \pm 4,9 \%$  ( $p < 0,01$ ;  $n=14$ ), wohingegen der  $I_{K_{SO}}$  von TRESK[ko]-Neuronen um  $12,95 \pm 2,4 \%$  nach Zugabe von 10  $\mu$ M LPA sank ( $p < 0,01$ ;  $n=19$ ; Abb. 21, B). Höchstwahrscheinlich kam dieser inverse Effekt durch TREK-1- und TASK-1-Kanälen zustande, die ebenfalls zum  $I_{K_{SO}}$  in DRG-Neuronen beitragen (Dobler et al., 2007) und durch LPA inhibiert werden können (siehe Abb. 14; Cohen et al., 2009).

Diese Ergebnisse der Patch-Clamp-Messungen an DRG-Neuronen zeigten deutlich die durch TRESK-Kanäle verursachte LPA-induzierte Aktivierung des  $I_{K_{SO}}$ . Ohne TRESK-Kanäle (TRESK[ko]) kam es durch LPA zur Aktivierung weniger stark exprimierter K2P-Kanäle und somit zur Hemmung des  $I_{K_{SO}}$ .

## 7.2 Zeitgleiche Aktivierung von TRESK- und TRPV1-Kanälen in DRG-Neuronen

DRG-Neurone von TRESK[wt]-Mäusen, die positiv auf Capsaicin reagierten (Abb. 22, A) und somit TRPV1-Rezeptoren exprimierten, zeigten nach der Applikation von 10  $\mu$ M LPA nicht nur den Anstieg des auswärts gerichteten  $I_{K_{SO}}$ , sondern auch den Anstieg eines nach einwärts gerichteten Stromes (Abb. 22, B), wie in Abbildung 22 exemplarisch zu sehen ist. Da der einwärts gerichtete TRPV1-Strom durch LPA aktiviert werden kann (Nieto-Posadas et al., 2011), handelte es sich hierbei höchstwahrscheinlich auch um TRPV1-Ströme. Vergleicht man dieses Ergebnis mit Neuronen von TRESK[ko]-Mäusen, sah man hier nach Zugabe von 10  $\mu$ M LPA nur die Erhöhung des Einwärtsstromes (Abb. 22, C).



**Abb. 22: Gleichzeitige Aktivierung von TRESK- und TRPV1-Strömen durch LPA in DRG-Neuronen.**

(A) Langzeitableitung bei einem Haltepotenzial von -80 mV von einem TRESK[wt]-Neuron. Die Zugabe von 5  $\mu$ M Capsaicin führt zur Aktivierung des TRPV1-Einwärtsstromes. (B) TRPV1 positive TRESK[wt]-Neurone zeigten nach Applikation vom 10  $\mu$ M LPA den gleichzeitigen Anstieg eines Auswärts- sowie Einwärtsstromes. (C) In TRESK[ko]-Neuronen wurde nur der einwärts gerichtete Strom durch LPA erhöht.

Genau wie im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten schon gezeigt, konnte auch in DRG-Neuronen durch LPA-Applikation gleichzeitig ein Auswärts- (TRESK) sowie ein Einwärtsstrom (TRPV1 und/oder TRPA1) aktiviert werden. Dieses Verhalten der beiden Ionenkanäle erlaubt grundsätzlich die Möglichkeit, dass der TRESK Kanal bei der Nozizeption während einer Entzündungsreaktion als balancierender Gegenspieler der TRP-Kanäle auftritt.

### 7.3 Erhöhte Erregbarkeit der DRG-Neurone durch LPA

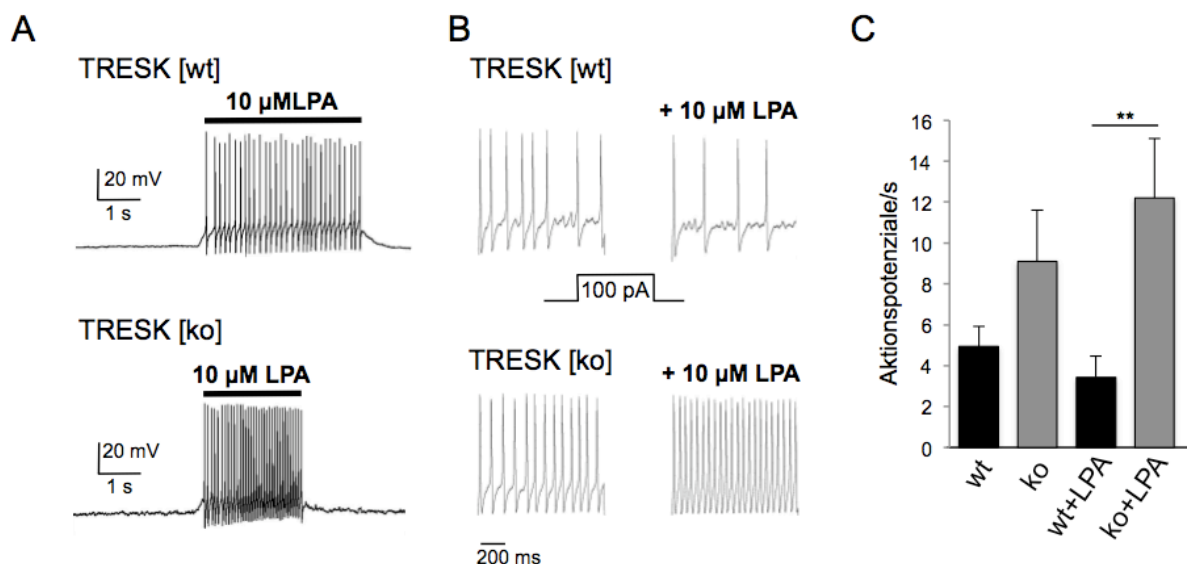
Kultivierte DRG Neurone sind im Vergleich zu *Xenopus* Oozyten ein gut geeignetes System, um die Erregbarkeit der Zellen zu untersuchen, da diese Zellen in der Lage sind Aktionspotenzialfrequenzen zu generieren. Um die Erregbarkeit der DRG-Neurone von TRESK[wt]- und TRESK[ko]-Mäusen aufzuzeigen, wurden die Aktionspotenzialfrequenzen im Strom-Klemme-Modus miteinander verglichen.

Die Neurone wurden leicht depolarisiert, so dass die Schwelle zum Generieren von Aktionspotenzialen noch nicht ganz erreicht wurde. Gab man unter diesen Bedingungen 10  $\mu$ M LPA zu den Neuronen, fingen sowohl TRESK[wt]- als auch TRESK[ko]-Neurone an zu feuern. Die Aktionspotenzialfrequenz in TRESK[ko]-

Neuronen war hierbei signifikant höher im Vergleich zu TRESK[wt]-Neuronen (Abb. 23, A), das auf eine erhöhte Erregbarkeit in TRESK[ko]-Neuronen hindeutete.

Um die Stromdichte der Zellen genau bestimmen zu können, wurde die Kapazität jeder Zelle aufgenommen. Es ergab sich für TRESK[wt]-Neurone ein Rheobasestrom von 7 pA/pF und für TRESK[ko]-Neurone von 5 pA/pF um Aktionspotenziale auslösen zu können. Der niedrigere Rheobasestrom in TRESK[ko]-Neuronen zeigte ebenfalls die erhöhte Erregbarkeit in diesen Zellen.

Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wurden TRESK[wt]- und TRESK[ko]-Neurone mit einem kleinen Durchmesser mit depolarisierenden 100 pA Strominjektionen depolarisiert (Abb. 23, B). Die Aktionspotenzialfrequenz für TRESK[wt]-Neurone lag bei  $4,9 \pm 1$  Aktionspotenziale/Sekunde ( $n=14$ ) und für TRESK[ko]-Neurone bei  $9,1 \pm 2,6$  Aktionspotenziale/Sekunde ( $n=10$ ; Abb. 23, B links und Abb. 23, C). Hier zeigte sich abermals die erhöhte Erregbarkeit von DRG Neuronen, die keine TRESK Kanäle besitzen (TRESK[ko]).



**Abb. 23: Erhöhte Erregbarkeit in DRG-Neuronen durch LPA.**

(A) Strom-Klemme-Aufnahmen zeigten Aktionspotenzialfrequenzen von TRESK[wt]- und TRESK[ko]-Neuronen nach Zugabe von 10  $\mu$ M LPA. (B) LPA Applikation nach 100 pA depolarisierenden Pulsen führte in TRESK[wt]-Neuronen zur Reduzierung (oben), in TRESK[ko]-Neuronen zu einer Erhöhung (unten) der Aktionspotenzialfrequenz. (C) Das Balkendiagramm zeigt zusammengefasst die Daten aus (B).

Unter den Bedingungen wie zuvor beschrieben, führte die Applikation von 10  $\mu$ M LPA zu unterschiedlichen Effekten. Die Aktionspotenzialfrequenz in TRESK[wt]-Neuronen nahm ab auf  $3,4 \pm 1$  Aktionspotenziale/Sekunde wohingegen die Aktionspotenzialfrequenz der TRESK[ko]-Neurone zunahm auf  $12,2 \pm 2,9$  Aktionspotenziale/Sekunde ( $p < 0,01$ ; Abb. 23, B rechts und Abb. 23 C).

Durch die LPA induzierte Aktivierung von TRESK-Kanälen in DRG-Neuronen von wildtypischen Tieren konnte die Erregung gehemmt werden. In Neuronen von ko-Tieren führte die Aktivierung von nur depolarisierenden Strömen (wie z.B. TRPV1 und/oder TRPA1) zu einer verstärkten Erregbarkeit.

Durch diese Versuche wurde gezeigt, dass es durch das Fehlen von TRESK-Kanälen in TRESK[ko]-Tieren nach LPA-Applikation nur zur Aktivierung eines depolarisierenden Stromes kam und das erhöhte die Aktionspotenzialfrequenz als Zeichen einer verstärkten Erregbarkeit. In DRG-Neuronen von wildtypischen Mäusen konnte durch LPA-induzierte Aktivierung der TRESK-Kanal als balancierender Gegenspieler der TRP-Kanäle auftreten und so die Erregbarkeit durch Erzeugen einer niedrigeren Aktionspotenzialfrequenz hemmen.

## VI. Diskussion

Die Aktivierung des TRESK-Stromes führt in neuronalen Zellen zur Hyperpolarisierung und somit zur Dämpfung der Erregbarkeit. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass TRESK-Kanäle in DRG-Neuronen mit TRP-Kanälen ko-exprimiert werden, deren Aktivität eine Depolarisierung hervorruft und den ersten Signalverarbeitungsschritt der Nozizeption darstellt. Außerdem werden TRESK-Ströme durch Rezeptoren von Entzündungsmediatoren beeinflusst. So führt die Ausschüttung von Schmerzmediatoren während einer Entzündungsreaktion einerseits zur Aktivierung depolarisierender Kanäle z.B. TRPV1 und TRPA1 und somit zu Schmerzempfinden. Andererseits aktivieren Rezeptoren dieser Entzündungsmediatoren auch hyperpolarisierend wirkende Kanäle, wie den TRESK-Kanal, die zu einer Hemmung der Erregbarkeit führen. Dieser Zusammenhang im Allgemeinen und dessen Auswirkungen auf das Schmerzempfinden sollen im Folgenden genauer diskutiert werden.

### 1. Ionenkanäle als Ziel für Analgetika

Ein guter Ansatz für die spezifische Behandlung von Schmerzsyndromen sind Ionenkanäle, die die Erregbarkeit der afferenten Nozizeptoren beeinflussen können. Waxman und Zamponi haben in ihrem Review die wichtigsten Ionenkanäle, die bei der Regulation der Erregbarkeit von afferenten Schmerzbahnen eine Rolle spielen, zusammengefasst (Waxman and Zamponi, 2014). Es wird neben spannungsgesteuerten  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen vor allem auf Kaliumkanäle eingegangen, die als Ziel für Analgetika dienen können. In der Zusammenfassung über K2P-Kanäle kommen die Autoren zu der Meinung, dass die Aktivierung von Hintergrundstromkanälen in afferenten Schmerzfasern eine mögliche Strategie für die Entwicklung von neuen Schmerzmitteln sein könnte (Waxman and Zamponi, 2014). Diese Ansicht wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit gestützt. Fehlt der hyperpolarisierende TRESK-Strom, sind DRG-Neurone sehr viel erregbarer und diese Erregbarkeit kann durch inflammatorische Substanzen noch gesteigert werden, wie die Versuche mit den DRG-Neuronen zeigten (siehe Abb. 23). Wäre es möglich, nicht aktive TRESK-Kanäle zu öffnen, würde das zur



Reduzierung der Erregbarkeit führen und vermutlich zu einem verminderten Schmerzempfinden im Falle einer Entzündung.

### **1.1 Expression von TRESK, TRP-Kanälen und LPA-Rezeptoren in DRG-Neuronen**

Der nicht-selektive Kationenkanal TRPV1 und spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Nav) sind die Hauptkomponenten des Ionenstromes, der für die Initiation der Depolarisierung nach einer Hitzestimulation sowie für die Weiterleitung der Aktionspotenziale in DRG-Neuronen verantwortlich ist. TRPV1 ist überwiegend in Spinalganglien in nozizeptiven Neuronen mit kleinem Durchmesser exprimiert (Caterina et al., 1997), zusammen mit anderen Ionenkanälen, die die zelluläre Erregbarkeit beeinflussen. Zu diesen anderen Ionenkanälen zählen die Mitglieder der K2P-Kanalfamilie, die ebenfalls signifikant in DRG-Neuronen exprimiert werden, wie in dieser Arbeit durch RT-PCR und Immunocytochemie und auch schon in vorangegangenen Studien gezeigt wurde (siehe Abb. 8 und 9; Dobler et al., 2007; Kang et al., 2005; Marsh et al., 2012). Diese Hintergrundstromkanäle sind hauptsächlich für die Stabilisierung des Membranpotenzials und der Reizschwelle für Aktionspotenziale verantwortlich. Der TRESK-Kanal ist unter den K2P-Kanälen in DRG-Neuronen am stärksten exprimiert. Zunächst wurden TREK-2 und TRESK durch elektrophysiologische Methoden als die Hauptkomponenten des Kaliumhintergrundstromes in Hinterwurzelganglien identifiziert (Kang and Kim, 2006). Wenig später konnte durch quantitative RT-PCR gezeigt werden, dass auf RNA-Ebene TRESK der am stärksten exprimierte K2P-Kanal in DRG-Neuronen ist (Dobler et al., 2007). Durch Immunocytochemie mit einem neu entwickelten, hoch spezifischen TRESK-Antikörper konnte in dieser Arbeit das Expressionsprofil des TRESK-Kanals auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden (siehe Abb. 9). Dabei wird TRESK nicht nur im Zellsoma der DRG-Neurone exprimiert, sondern kommt auch in den axonalen Kompartimenten vor. Die Expression des TRESK-Kanals in Axonen und Dendriten von DRG-Neuronen deutet auf eine sensorische Funktion in der Peripherie hin. So können Informationen, z.B. die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren bei einer Verletzung, aus der Umgebung wahrgenommen und weiterverarbeitet werden.

Außerdem zeigen die Ergebnisse eine eindeutige Ko-Expression der TRESK-Kanäle und der potenziell schmerzinduzierenden Kanäle TRPA1 und TRPV1 in

Spinalganglien (siehe Abb. 8). Für TRPV1 ist sogar die Ko-Lokalisation im gleichen Neuron nachgewiesen worden (siehe Abb. 9).

LPA ist in einer Reihe von biologischen Flüssigkeiten wie z.B. dem Blutplasma und Serum sowie in vielen Organen inklusive dem Nervensystem zu finden (Noguchi et al., 2009). Die Expression von LPA-Rezeptoren in DRG-Neuronen wurde von Inoue und Kollegen schon gezeigt (Inoue et al., 2004). Zusätzlich zu dem in der Studie nachgewiesenem LPA<sub>1</sub>-Rezeptor könnte in dieser Arbeit auch noch LPA<sub>3</sub>-Rezeptoren in DRG-Neuronen nachgewiesen werden und die Expression von LPA<sub>2</sub>-, LPA<sub>4</sub>- und LPA<sub>5</sub>-Rezeptoren ausgeschlossen werden (siehe Abb. 8).

## 1.2 Regulation von K2P-Kanälen durch G-Proteine

Sowohl TREK- als auch TRESK-Kanäle werden durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren reguliert (Fink et al., 1996; Czirjak et al., 2004). Durch die Aktivierung von G $\alpha$ s- und G $\alpha$ q-gekoppelte Rezeptoren werden TREK-1- und TREK-2-Ströme herunter reguliert. Das geschieht über die Phosphorylierung durch entweder G $\alpha$ s-aktivierte Proteinkinase A (Patel et al., 1998; Lesage et al., 2000) oder durch G $\alpha$ q-aktivierte PKC (Murbartian et al., 2005). Im Gegensatz dazu werden TRESK-Kanäle durch den G $\alpha$ q-Signalweg aktiviert (siehe Abb. 10). Dazu ist der Anstieg von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> sowie die Phosphorylierung des TRESK-Kanals durch Calcineurin notwendig (siehe Abb. 13; Czirjak et al., 2004; Czirjak and Enyedi, 2006). In ihrer Studie von 2004 nutzten Czirják und Kollegen den muskarinischen M1-Rezeptor ko-exprimiert mit TRESK-Kanälen in *Xenopus* Oozyten, um TRESK-Kanäle zu aktivieren. Wurde zuvor das intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> verbraucht oder gebunden, konnte keine TRESK-Aktivierung erzielt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde nicht der intrazelluläre Kalziumanstieg unterbunden, sondern andere Komponenten des intrazellulären Signalwegs genutzt, und zwar die Hemmung der PLC wie auch die Mutation des Bindungsmotivs für Calcineurin. Beide Versuche führten zu der Unterdrückung des TRESK-Stromes, wie auch bei den Versuchen von Czirják und Kollegen.

## 2. Einfluss von Entzündungsmediatoren auf K2P-Kanäle

Verletzungen rufen Entzündungsprozesse hervor, die zur Vermeidung des schädlichen Reizes, Heilung des geschädigten Gewebes und protektivem Verhalten führen. Dass TRESK-Kanäle bei der Nozizeption während einer Entzündungsreaktion eine bedeutende Rolle spielen, wird unter anderem dadurch deutlich, dass in Ratten nach einer mit „complete Freund`s adjuvants“ verursachten Entzündung die TRESK-Transkription zurück geht und das spontane Schmerzverhalten zunimmt (Marsh et al., 2012). Hier zeigt sich, dass der Rückgang der TRESK-Expression und erhöhtes Schmerzempfinden zusammenhängen.

Viele Entzündungsmediatoren entwickeln ihre Wirkung durch die Aktivierung von GPCR. Die Versuche mit den Entzündungsmediatoren Bradykinin, Serotonin und Histamin zeigten die Aktivierung von TRESK-Strömen durch verschiedene G $\alpha$ q-gekoppelte Rezeptoren (B<sub>1</sub>-, B<sub>2</sub>-, H<sub>1</sub>- und 5HT<sub>2C</sub>-Rezeptoren) in *Xenopus* Oozyten (siehe Abb. 10). In DRG-Neuronen kommt es ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Einzelkanalaktivität nach der Applikation von Mediatoren wie Acetylcholin, Glutamat und Histamin (Kang et al., 2008). Diese Aktivierung von TRESK-Kanälen durch Gq-Protein gekoppelte Rezeptoren, die bei Entzündung von Bedeutung sind, in einem nativen System, stimmt mit den Ergebnissen aus dem rekombinanten System der *Xenopus* Oozyten überein (siehe Abb. 10).

Neben den klassischen, gut beschriebenen Entzündungsmediatoren wie Bradykinin, Histamin und Serotonin tragen noch viele andere Substanzen zur Hyperalgesie während einer Entzündung bei. Oxidierte Lipide wie LPA spielen ebenfalls eine Rolle bei der Modulation der Nozizeption. Wird LPA intraplantar in die Pfote von Mäusen injiziert, verursacht diese Injektion periphere Nozizeption (zusammengefasst in Noguchi et al., 2009). Die direkte Aktivierung der TRPV1-Kanäle durch LPA wird als molekularer Mechanismus angesehen, der zur initialen Depolarisierung der Zellmembran und zur Auslösung von Aktionspotenzialen in DRG-Neuronen führt (Nieto-Posadas et al., 2011). Auch erhöht sich während einer durch UVB-Strahlung verursachten Hautentzündung (Sonnenbrand) die LPA-Konzentration im entzündeten Gewebe und es entsteht eine periphere Hyperalgesie, die nicht mit Cyclooxygenasehemmern behandelt werden kann (Sisignano et al., 2013). Cyclooxygenasehemmer werden oft gegen Entzündungsschmerz eingesetzt, da viele der klassischen Entzündungsmediatoren mit Hilfe der Cyclooxygenase synthetisiert

werden. LPA entsteht durch die Abspaltung einer Cholingruppe von Lysophosphatidcholin mit Hilfe von Autotaxin (Blaho and Hla, 2011). Entzündungsschmerz, der durch LPA verursacht wird, kann also nicht durch Cyclooxygenasehemmer behandelt werden, wie es in der Studie von Sisignano und Kollegen gezeigt wurde.

TRPV1-Kanäle sind stark in schmerzleitenden Neuronen exprimiert und können durch direkte Interaktion mit LPA aktiviert werden (Nieto-Posadas et al., 2011). In dieser Arbeit wurden eindeutig gezeigt, dass  $G\alpha_q$ -gekoppelte LPA-Rezeptoren auch TRESK-Kanäle aktivieren können, da durch die Hemmung der PLC und durch das Verhindern der Interaktion von Calcineurin mit dem TRESK-Kanal (Czirjak et al., 2004) der durch LPA induzierte Kaliumstrom komplett blockiert werden konnte (siehe Abb. 11 und 13).

Im Vergleich mit Histamin, Bradykinin und Serotonin war LPA der effektivste Aktivator des TRESK-Stromes (siehe Abb. 10 und 11). Allerdings kann der Signalweg über  $G\alpha_q$ -gekoppelte LPA-Rezeptoren auch zur Inhibition von K2P-Kanälen führen wie in dieser Arbeit für TASK-1 und TREK-1 im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten gezeigt wurde (siehe Abb. 14). Cohen und Kollegen zeigten bereits, dass TREK-1 in einem heterologen System durch LPA herunter reguliert werden kann (Cohen et al., 2009). Hierbei spielen der Anstieg von intrazellulärem  $Ca^{2+}$  und die Bindung von Calcineurin aber keine Rolle. Es handelt sich vielmehr um eine direkte Interaktion mit LPA. Der K2P-Kanal TASK-1 kann durch  $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren, wie z.B. durch Serotoninrezeptoren, inhibiert werden (Sirois et al., 2002; Chen et al., 2006). In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Inhibition von TASK-1 durch LPA-Applikation gezeigt (siehe Abb. 14).

Diese Versuche zeigten, dass der K2P-Kanal TRESK eine Ausnahme in der K2P-Kanalfamilie ist, da er der einzige Hintergrundstromkanal ist, der durch LPA aktiviert werden kann. Die anderen Mitglieder der K2P-Kanäle, wie z.B. TREK-1 und TASK-1, werden durch diese Substanz gehemmt.

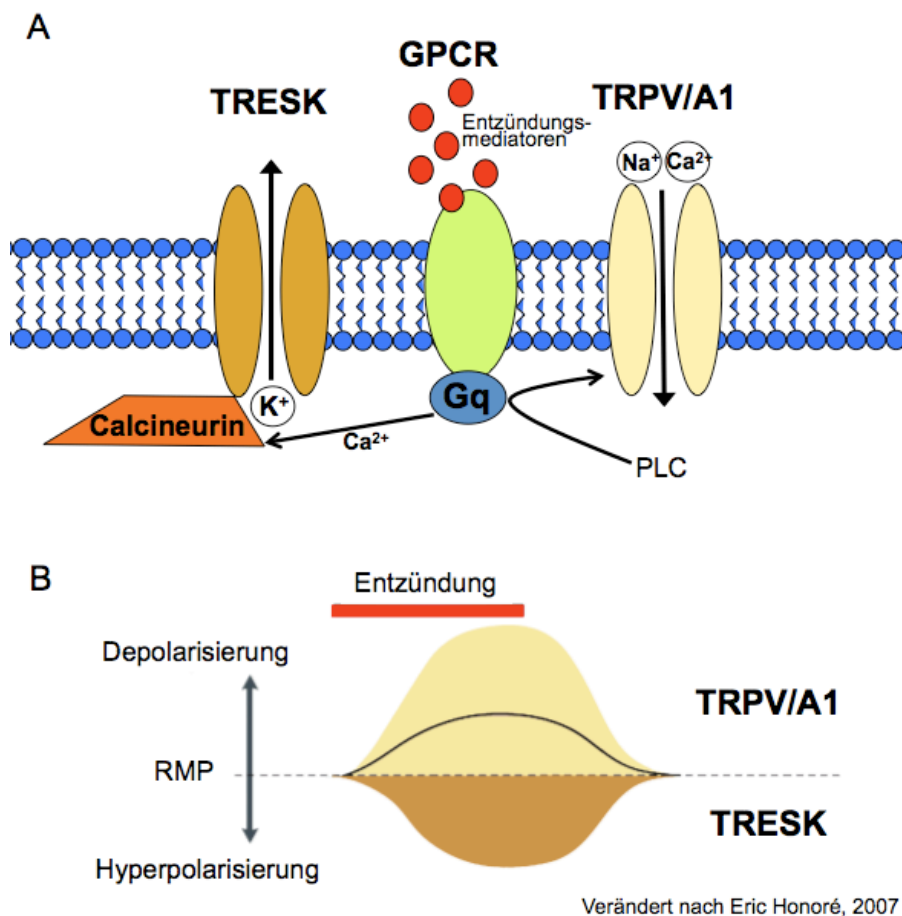
Dieser Aspekt und die starke Expression in DRG-Neuronen weisen darauf hin, dass TRESK unter Entzündungsbedingungen eine besondere Rolle für die Nozizeption spielen könnte. TRESK wird durch die Rezeptoren, die bei Entzündung aktiviert werden, ebenfalls aktiviert und kann somit durch Hyperpolarisierung des Membranpotenzials einer Erregung der Zelle entgegen wirken.

### 3. Ko-Aktivierung von K2P- und TRP-Kanälen

Das Expressionsmuster der verschiedenen Ionenkanäle und die Art und Weise der Regulation durch entsprechende Mediatoren bestimmen die Erregbarkeit eines Neurons. Um den Wechselwirkungen in einem schmerzleitenden Neuron näher zu kommen, wurden in einem ersten Schritt TRESK-Kanäle zusammen mit TRPV1- bzw. TRPA1-Rezeptoren in *Xenopus* Oozyten exprimiert (siehe Abb. 16 und 18). Sowohl TRESK also auch die TRP-Kanäle wurden gleichzeitig, von derselben Substanz (LPA), in der gleichen Zelle aktiviert und führten zu entgegengesetzten Strömen. Zusätzlich kam es zu einer Verschiebung des Umkehrpotenzials in einen Bereich zwischen den jeweiligen Umkehrpotenzialen der beiden Ionenkanäle. Die Aktivierung beider Kanäle durch LPA sollte zu einem limitierten exzitatorischen Effekt der TRPV1- bzw. TRPA1-Ströme führen, verursacht durch die TRESK-Auswärtsströme und die damit einhergehende Hyperpolarisierung des Neurons, wie es in dem Modell von Abbildung 24 gezeigt ist. Während einer Entzündungsreaktion werden beide Kanaltypen aktiviert (Abb. 24, A). Der hyperpolarisierende Strom der TRESK-Kanäle dämpft die Depolarisierung durch die TRP-Kanäle und das resultiert in einer verminderten Erregung des Neurons (Abb. 24, B, schwarze Kurve).

Der ausgleichende Effekt der K2P-Hintergrundströme auf erregbare Zellen wurde zuvor schon von Eric Honoré beschrieben (Honoré, 2007). So kann Hitzestimulation sowohl TRPV1 als auch TREK-1 aktivieren (Caterina et al., 1997; Maingret et al., 2000). Diese Aktivierung führt, genau wie im Beispiel der LPA-Aktivierung von TRESK und TRP-Kanälen, zu entgegengesetzten Effekten innerhalb der Zelle. Dies führt zu dem Konzept, dass die Auslösung eines Schmerzsignals durch hyperpolarisierende Kaliumströme ausgeglichen werden könnte (Honoré, 2007). Das gleiche Prinzip wurde in dieser Arbeit durch die Aktivierung der entgegengesetzten TRP- und TRESK-Kanäle durch LPA aufgezeigt (siehe Abb.24).

Neben TRESK sind allerdings auch noch andere K2P-Kanäle in Spinalganglienneuronen etwas schwächer exprimiert. So könnte der hemmende Effekt von LPA auf TREK-1 oder TASK-1 den exzitatorischen Effekt durch TRPV1- und TRPA1-Aktivierung unterstützen.



**Abb. 24: Modell des regulierenden Effekts von TRESK während einer Entzündung.** (A) Die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren führt, entweder durch Aktivierung von GPCR oder durch direkte Interaktion mit Ionenkanälen, zur Aktivierung von hyperpolarisierenden TRESK-Strömen und gleichzeitig zu depolarisierenden TRP-Strömen. (B) Die Depolarisierung des Nozizeptors durch TRP-Ströme wird durch gleichzeitige Aktivierung von TRESK moduliert. Dies resultiert in einer gedämpften Erregung des Neurons (schwarze Kurve). Verändert nach Eric Honoré, 2007.

#### 4. Regulation der Erregbarkeit in Neuronen

Die Erregbarkeit einer Zelle wird im Wesentlichen durch das Membranpotential bestimmt. Wird die Zelle über eine bestimmte Schwelle hinweg depolarisiert, werden Aktionspotenziale ausgelöst. Wird das Membranpotential durch die Hintergrundströme hyperpolarisiert, ist es schwieriger diese Schwelle zu erreichen. Wie groß der Einfluss von TRESK auf die Erregbarkeit einer Zelle ist, wird im Folgenden genauer diskutiert.

#### 4.1 Überexpression von TRESK in einer neuronalen Zelllinie

Die Transfektion der DRG-ähnlichen F-11 Zellen mit mTRESK-cDNA führte zu großen, auswärtsgerichteten Kaliumströmen, die das Ruhemembranpotenzial stabilisierten. TRESK-Kanäle führen anscheinend nicht zu großen Ruhemembranpotenzialverschiebungen, da das Ruhemembranpotenzial sowohl in nicht-transfizierten also auch in mTRESK-transfizierten Zellen gleich ist. Vergleicht man die Ruhemembranpotenziale von TRESK[wt]- und TRESK[ko]-Mäusen, kann ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dafür sind andere elektrophysiologische Parameter der Aktionspotenziale verändert. So zeigten Neurone von TRESK[ko]-Mäusen eine kürzere Aktionspotenzialdauer, eine größere Amplitude der Nach-Hyperpolarisation und einen kleineren Rheobasestrom (Dobler et al., 2007). Die Verkleinerung des Rheobasestromes in DRG-Neuronen, die keine TRESK-Ströme besitzen, wurde in dieser Arbeit ebenfalls festgestellt. Die verkürzte Aktionspotenzialdauer und die größere Nach-Hyperpolarisation in TRESK[ko]-Tieren deuten eher gegen das Fehlen eines Kaliumstromes hin (siehe Diskussion in Dobler et al., 2007). Die anderen Beobachtungen sprechen dafür, dass die Funktion der TRESK-Kanäle nicht hauptsächlich darin besteht das Ruhemembranpotenzial zu stabilisieren, sondern die zelluläre Erregbarkeit bei schwacher Membrandepolarisierung zu hemmen. Das zeigte sich auch bei der Expression von TRESK in den F-11 Zellen, die zur Inhibition der Depolarisierung und zur Unterdrückung der Entstehung von Aktionspotenzialen führte (siehe Abb. 20). Hier zeigte sich eindeutig der Einfluss von TRESK-Kanälen auf die zelluläre Erregbarkeit.

#### 4.2 Effekte von TRESK auf Trigeminal- und Spinalganglien

Die Überexpression von TRESK-Untereinheiten in kultivierten TG-Neuronen der Maus führt zur Verdoppelung des exprimierten TRESK-Kanalproteins (Guo and Cao, 2014). Durch diesen Anstieg des TRESK-Proteins kommt es zur Erhöhung des Lamotrigin-sensitiven Kaliumauswärtsstromes und des gesamten Kaliumhintergrundstromes ( $I_{K_{SO}}$ ). Dies hat die verringerte Anzahl von ausgelösten Aktionspotenzialen zur Folge. Diese Beobachtung von Guo und Cao stimmt mit den Ergebnissen der Strom-Klemme-Versuche an den Spinalganglien-Neuronen der TRESK[ko]-Maus überein, die aufgrund der fehlenden TRESK-Ströme eine erhöhte Aktionspotenzialfrequenz aufweisen (siehe Abb. 21 und 23).

Transfiziert man kultivierte TG-Neurone mit einer inaktiven TRESK-Mutante, zeigen diese Neurone einen dominant-negativen Effekt auf den endogenen TRESK-Strom, sowie ein verringertes Schwellenpotenzial zur Generierung von Aktionspotenzialen und höhere Aktionspotenzialfrequenzen (Liu et al., 2013). Das alles führt zu einer erhöhten zellulären Erregbarkeit in den transfizierten TG-Neuronen. Der dominant-negative Effekt der inaktiven TRESK-Mutante ist auf die Heterodimerisierung von wildtypischen und mutierten TRESK-Kanaluntereinheiten zurückzuführen.

Wird die TRESK-Kanal-Expression in Ratten durch intrathekale Injektion von siRNA in die Hinterpfote *in vivo* gehemmt, kommt es zu signifikant erhöhten Reaktionen auf mechanische Schmerzstimuli in DRG-Neuronen (Tulleuda et al., 2011).

All diese verschiedenen Studien zeigen den schmerzlindernden Effekt der TRESK-Kanal-Aktivität auf.

Die Strom-Klemme-Versuche dieser Arbeit zeigten, dass die simultane Ko-Aktivierung der TRESK-Kanäle durch LPA-Applikation die durch Depolarisierung verursachte Aktionspotenzialfrequenz in wildtypischen C3H Mäusen (TRESK[wt]) herabsetzen konnte. Im Vergleich dazu fehlt den TRESK[ko]-Mäusen dieser kompensatorische Mechanismus und die durch Depolarisierung der Zellmembran induzierte Aktivität der Zelle wurde erhöht (siehe Abb. 23).

Analgetische Komponenten, wie z.B. lokale Anästhetika, unterdrücken normalerweise depolarisierende Ionenströme in DRG-Neuronen, um die Entstehung sensorischer Potenziale und die Weiterleitung von Aktionspotenzialen in der Peripherie zu verhindern. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine alternative Möglichkeit auf, um Schmerzsignale, ausgehend von den Fasern der DRG-Neurone, zu unterdrücken. So kann durch die Verstärkung von hyperpolarisierenden Ionenströmen die durch depolarisierende Ströme induzierte Erregung der neuronalen Zellen ausgeglichen werden. Diese Beobachtung ergänzt das Konzept, das Eric Honoré für TRPV1 und TREK-1 aufgestellt hat (Honoré, 2007; vergleiche auch Abb. 24). Allerdings hemmen entzündungsfördernde Mediatoren TREK-1-Ströme (siehe Abb. 14; Alloui et al., 2006) und diese Hemmung der Kaliumauswärtsströme würde die Erregung der schmerzleitenden Neurone fördern. Die Aktivierung der TRESK-Ströme unter Entzündungsbedingungen (Ausschüttung von LPA oder auch Bradykinin, Histamin oder Serotonin) reduziert den exzitatorischen Einfluss der TRPV1-Kanäle und hemmt damit die Nozizeption.



Es ist anzunehmen, dass der Effekt der entzündungsfördernden Mediatoren auf TRESK-Kanäle, der dominanter Effekt ist, da TRESK im Vergleich zu TREK-1 stärker in DRG-Neuronen vorkommt (Dobler et al., 2007).

## 5. TRESK und Migräne

Die Bedeutung von TRESK für das Schmerzempfinden wird insbesondere auch dadurch deutlich, dass eine dominant-negative Mutation des TRESK-Kanals mit einer erblichen Form der Migräne mit Aura in Verbindung gebracht wird (Lafreniere et al., 2010; Lafreniere and Rouleau, 2011). Hierbei führt die Mutation zur Verschiebung des Lesemusters und zum Verlust der Kanalfunktion. Der reduzierende Effekt auf die Stromamplitude des TRESK-Kanals ist dominant-negativ (Lafreniere et al., 2010). Die verringerte Stromdichte der mutierten TRESK-Kanäle kann auch zum Teil durch einen gestörten Transport der Kanaluntereinheiten zur Zellmembran zustande kommen (Liu et al., 2013). Diese Studien legen die Vermutung nahe, dass TRESK-Kanäle bei der Pathogenese erblicher Formen von Migräne mit Aura von entscheidender Bedeutung sein könnten und dass der TRESK-Kanal ein vielversprechendes Ziel für neue Therapeutika gegen Migräne sein könnte.

Über den Pathomechanismus von Migräne gibt es verschiedene Hypothesen, die zum Teil ineinander übergehen. Bei der Übererregbarkeits-Hypothese der Migräne beobachtet man eine Depolarisierung im occipitalen Cortex. Dieser Depolarisierung könnte durch die Aktivierung von hyperpolarisierenden Hintergrundströmen entgegen gewirkt werden. Dies könnte dann eventuell einen Migräneanfall abschwächen. Bei der Hypothese der neurogenen Entzündung kommt es zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Moskowitz, 1993). Wird LPA ausgeschüttet und die TRESK-Kanalfunktion ist nicht vorhanden, kommt es ebenfalls zu einer erhöhten Erregbarkeit der beteiligten Neuronen, die wiederum einen Migräneanfall fördern würde.

In einer Studie über Patienten, die an Migräne mit Aura leiden, wurde Lamotrigin zur Bekämpfung der Symptome eingesetzt (Pascual et al., 2004). Es wurde in dieser Studie kein schmerzreduzierender Effekt von Lamotrigin festgestellt. Da Lamotrigin ein TRESK-Kanalinhibitor ist, würde die Anwendung von Lamotrigin durch die

Hemmung des TRESK-Stromes zur erhöhten Erregbarkeit und eher zum Anstieg der Schmerzen als zu deren Reduzierung führen. Pascual und Kollegen konnten bei 68 % der Patienten eine Reduzierung der Aura-Symptome, aber nicht der Schmerzsymptome feststellen (Pascual et al., 2004).

Basierend auf einem 3D-Strukturmodell von TRESK haben Sehgal und Mitarbeiter ein Medikamenten-Screening für neue therapeutische Pharmazeutika gegen Migräne durchgeführt (Sehgal et al., 2014). Hierbei wurde Ergotamin und PB-414901692 als gute Kandidaten identifiziert, die effektiv an TRESK-Kanäle binden könnten. Allerdings sollte die Bindung dieser Komponenten zu einer Hemmung des Ionenkanals führen und nicht zu einer Aktivierung. Eine Hemmung des TRESK-Stromes würde jedoch zu einer erhöhten Erregbarkeit der neuronalen Zellen und somit zu einem verstärkten Schmerzsignal anstatt zur Linderung der Migräne führen.

## **6. Ausblick**

Chronischer Schmerz, der seine Bedeutung als Warn- und Leitsignal für den Körper verloren hat, verursacht jedes Jahr enorme körperliche und auch ökonomische Belastungen. Die Bekämpfung der Schmerzsymptome mit Schmerzmitteln ist oft nicht ausreichend wirksam und unspezifische Schmerzmedikamente haben oft starke Nebenwirkungen, da sie nicht gezielt gegen die Ursache des Schmerzes eingesetzt werden können, weil diese oft nicht vollends geklärt ist. Es ist also von enormer Bedeutung die Entstehung von Schmerz und alle beteiligten Faktoren genau zu kennen, um ganz spezifisch wirkende Schmerztherapeutika ohne Nebenwirkungen auf den restlichen Organismus zu entwickeln.

In dieser Arbeit ist es gelungen, einen ganz speziellen Ionenkanal (TRESK) zu charakterisieren, der bei chronischen Schmerzen (vor allem bei Migräne mit Aura) sowie bei Entzündungen eine wichtige Beteiligung haben könnte und zu zeigen, dass Substanzen, die diesen Kanal aktivieren können, analgetisch wirken könnten, sowohl generell beim Schmerzempfinden als auch ganz speziell bei Entzündungsschmerz. So könnten TRESK-Kanäle eine vielversprechende molekulare Zielstruktur für die Behandlung von Migräne sein. In einer Studie wurde Cloxyquin, eine anti-bakterielle und anti-fungale Substanz, als potenter TRESK-Kanal-Aktivator identifiziert (Wright

et al., 2013). Könnten TRESK-Kanäle durch Cloxyquin aktiviert werden, könnte das zur Hemmung der Erregbarkeit und zur Linderung der Migränekopfschmerzen führen.

Außerdem werfen die Ergebnisse dieser Arbeit weitere interessante Fragestellungen auf. Eine Studie von besonderem Interesse wäre das Schmerzverhalten der TRESK[ko]-Mäuse genau zu untersuchen und mit wildtypischen Mäusen zu vergleichen. Hierbei sollte vor allem auf Unterschiede bei Entzündungsbedingungen geachtet werden. Zum Beispiel könnte man versuchen durch LPA eine Entzündung hervorzurufen, um die verschiedenen Mausgruppen dann in Schmerztests zu vergleichen.

Da in unserer Arbeitsgruppe ein sehr gut funktionierender Antikörper gegen das TRESK-Kanalprotein entwickelt wurde, ist es nun möglich weitergehend Studien mit diesem Antikörper durchzuführen. Man könnte die Lokalisation der TRESK-Kanäle innerhalb der Neurone genauer untersuchen, wie z.B. ihre Verteilung in den axonalen Ausläufern. Außerdem könnten auch genauere Ko-Expressions-Studien mit anderen Kanälen und Rezeptoren für die es gute Antikörper gibt, durchgeführt werden.

Die wichtigste Erkenntnis aus dieser Arbeit ist, dass schmerzfördernde Mediatoren durch ihre Aktivierung von TRESK die Nozizeption und somit vermutlich auch das Schmerzempfinden reduzieren können. Die bedeutendste Schlussfolgerung, die aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit gezogen werden kann, ist, dass ein spezifischer TRESK-Kanalaktivator potenziell als Schmerzmedikament dienen könnte. Wichtig hierbei wäre, dass dieser Kanalöffner sehr spezifisch nur den TRESK-Kanal anspricht. TRESK wird sehr spezifisch nur in Spinal-, Trigeminalganglien und sekundär lymphatischen Geweben (Milz und Dünndarm) exprimiert (F.Döring, nicht publiziert). Aufgrund dieser spezifischen Expression des TRESK-Kanals sollte es bei Schmerztherapien, die diesen Kanal betreffen, kaum zu Nebenwirkung in anderen Geweben kommen.

## VII. Literatur

1. Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noel, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., *et al.* (2006). TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in polymodal pain perception. *Embo J* 25, 2368-2376.
2. Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267-284.
3. Bautista, D.M., Pellegrino, M., and Tsunozaki, M. (2012). TRPA1: A gatekeeper for inflammation. *Annu Rev Physiol* 75, 181-200.
4. Bautista, D.M., Sigal, Y.M., Milstein, A.D., Garrison, J.L., Zorn, J.A., Tsuruda, P.R., Nicoll, R.A., and Julius, D. (2008). Pungent agents from Szechuan peppers excite sensory neurons by inhibiting two-pore potassium channels. *Nat Neurosci* 11, 772-779.
5. Bender, F.L., Mederos, Y.S.M., Li, Y., Ji, A., Weihe, E., Gudermann, T., and Schafer, M.K. (2005). The temperature-sensitive ion channel TRPV2 is endogenously expressed and functional in the primary sensory cell line F-11. *Cell Physiol Biochem* 15, 183-194.
6. Blaho, V.A., and Hla, T. (2011). Regulation of mammalian physiology, development, and disease by the sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors. *Chem Rev* 111, 6299-6320.
7. Brone, B., Peeters, P.J., Marrannes, R., Mercken, M., Nuydens, R., Meert, T., and Gijssen, H.J. (2008). Tear gasses CN, CR, and CS are potent activators of the human TRPA1 receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 231, 150-156.
8. Callejo, G., Giblin, J.P., and Gasull, X. (2013). Modulation of TRESK background K<sup>+</sup> channel by membrane stretch. *PLoS One* 8, e64471.
9. Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.
10. Chae, Y.J., Zhang, J., Au, P., Sabbadini, M., Xie, G.X., and Yost, C.S. (2010). Discrete change in volatile anesthetic sensitivity in mice with inactivated tandem pore potassium ion channel TRESK. *Anesthesiology* 113, 1326-1337.
11. Chavez, R.A., Gray, A.T., Zhao, B.B., Kindler, C.H., Mazurek, M.J., Mehta, Y., Forsayeth, J.R., and Yost, C.S. (1999). TWIK-2, a new weak inward rectifying member of the tandem pore domain potassium channel family. *J Biol Chem* 274, 7887-7892.
12. Chemin, J., Girard, C., Duprat, F., Lesage, F., Romey, G., and Lazdunski, M. (2003). Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K<sup>+</sup> channels. *Embo J* 22, 5403-5411.

13. Chen, X., Talley, E.M., Patel, N., Gomis, A., McIntire, W.E., Dong, B., Viana, F., Garrison, J.C., and Bayliss, D.A. (2006). Inhibition of a background potassium channel by Gq protein alpha-subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 3422-3427.
14. Chiesa, N., Rosati, B., Arcangeli, A., Olivotto, M., and Wanke, E. (1997). A novel role for HERG K<sup>+</sup> channels: spike-frequency adaptation. *J Physiol* *501* ( Pt 2), 313-318.
15. Choi, J.W., Herr, D.R., Noguchi, K., Yung, Y.C., Lee, C.W., Mutoh, T., Lin, M.E., Teo, S.T., Park, K.E., Mosley, A.N., *et al.* (2010). LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *50*, 157-186.
16. Cohen, A., Sagron, R., Somech, E., Segal-Hayoun, Y., and Zilberberg, N. (2009). Pain-associated signals, acidosis and lysophosphatidic acid, modulate the neuronal K(2P)2.1 channel. *Mol Cell Neurosci* *40*, 382-389.
17. Contos, J.J., Fukushima, N., Weiner, J.A., Kaushal, D., and Chun, J. (2000). Requirement for the Ipa1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 13384-13389.
18. Contos, J.J., Ishii, I., Fukushima, N., Kingsbury, M.A., Ye, X., Kawamura, S., Brown, J.H., and Chun, J. (2002). Characterization of Ipa(2) (Edg4) and Ipa(1)/Ipa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to Ipa(2). *Mol Cell Biol* *22*, 6921-6929.
19. Cooper, B.Y., Johnson, R.D., and Rau, K.K. (2004). Characterization and function of TWIK-related acid sensing K<sup>+</sup> channels in a rat nociceptive cell. *Neuroscience* *129*, 209-224.
20. Cox, J.J., Reimann, F., Nicholas, A.K., Thornton, G., Roberts, E., Springell, K., Karbani, G., Jafri, H., Mannan, J., Raashid, Y., *et al.* (2006). An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* *444*, 894-898.
21. Czirjak, G., and Enyedi, P. (2006). Targeting of calcineurin to an NFAT-like docking site is required for the calcium-dependent activation of the background K<sup>+</sup> channel, TRESK. *J Biol Chem* *281*, 14677-14682.
22. Czirjak, G., Toth, Z.E., and Enyedi, P. (2004). The two-pore domain K<sup>+</sup> channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. *J Biol Chem* *279*, 18550-18558.
23. Dobler, T., Springauf, A., Tovornik, S., Weber, M., Schmitt, A., Sedlmeier, R., Wischmeyer, E., and Doring, F. (2007). TRESK two-pore-domain K<sup>+</sup> channels constitute a significant component of background potassium currents in murine dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* *585*, 867-879.
24. Dumont, J.N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* *136*, 153-179.

25. Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997). TASK, a human background K<sup>+</sup> channel to sense external pH variations near physiological pH. *Embo J* 16, 5464-5471.
26. Duprat, F., Lesage, F., Patel, A.J., Fink, M., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000). The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *Mol Pharmacol* 57, 906-912.
27. Enyedi, P., Braun, G., and Czirjak, G. (2012). TRESK: the lone ranger of two-pore domain potassium channels. *Mol Cell Endocrinol* 353, 75-81.
28. Estivill-Torrus, G., Llebregz-Zayas, P., Matas-Rico, E., Santin, L., Pedraza, C., De Diego, I., Del Arco, I., Fernandez-Llebregz, P., Chun, J., and De Fonseca, F.R. (2008). Absence of LPA1 signaling results in defective cortical development. *Cereb Cortex* 18, 938-950.
29. Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1996). Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K<sup>+</sup> channel. *Embo J* 15, 6854-6862.
30. Fink, M., Lesage, F., Duprat, F., Heurteaux, C., Reyes, R., Fosset, M., and Lazdunski, M. (1998). A neuronal two P domain K<sup>+</sup> channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *Embo J* 17, 3297-3308.
31. Franks, N.P., and Honore, E. (2004). The TREK K2P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci* 25, 601-608.
32. Garcia-Anoveros, J., and Nagata, K. (2007). Trpa1. *Handb Exp Pharmacol*, 347-362.
33. Gerhold, K.A., and Bautista, D.M. (2009). Molecular and cellular mechanisms of trigeminal chemosensation. *Ann N Y Acad Sci* 1170, 184-189.
34. Goldman, D.E. (1943). Potential, Impedance, and Rectification in Membranes. *J Gen Physiol* 27, 37-60.
35. Goldstein, S.A., Price, L.A., Rosenthal, D.N., and Pausch, M.H. (1996). ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13256-13261.
36. Guo, Z., and Cao, Y.Q. (2014). Over-expression of TRESK K(+) channels reduces the excitability of trigeminal ganglion nociceptors. *PLoS One* 9, e87029.
37. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391, 85-100.
38. Hodgkin, A.L., and Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol* 108, 37-77.

39. Honore, E. (2007). The neuronal background K<sub>2</sub>P channels: focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci* 8, 251-261.
40. Inoue, M., Rashid, M.H., Fujita, R., Contos, J.J., Chun, J., and Ueda, H. (2004). Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat Med* 10, 712-718.
41. Jablonka, S., Karle, K., Sandner, B., Andreassi, C., von Au, K., and Sendtner, M. (2006). Distinct and overlapping alterations in motor and sensory neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 15, 511-518.
42. Ji, R.R., Xu, Z.Z., and Gao, Y.J. (2014). Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov* 13, 533-548.
43. Julius, D., and Basbaum, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-210.
44. Kang, D., Choe, C., and Kim, D. (2005). Thermosensitivity of the two-pore domain K<sup>+</sup> channels TREK-2 and TRAAK. *J Physiol* 564, 103-116.
45. Kang, D., and Kim, D. (2006). TREK-2 (K<sub>2</sub>P10.1) and TRESK (K<sub>2</sub>P18.1) are major background K<sup>+</sup> channels in dorsal root ganglion neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 291, C138-146.
46. Kang, D., Kim, G.T., Kim, E.J., La, J.H., Lee, J.S., Lee, E.S., Park, J.Y., Hong, S.G., and Han, J. (2008). Lamotrigine inhibits TRESK regulated by G-protein coupled receptor agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 367, 609-615.
47. Kang, D., Mariash, E., and Kim, D. (2004). Functional expression of TRESK-2, a new member of the tandem-pore K<sup>+</sup> channel family. *J Biol Chem* 279, 28063-28070.
48. Karashima, Y., Talavera, K., Everaerts, W., Janssens, A., Kwan, K.Y., Vennekens, R., Nilius, B., and Voets, T. (2009). TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1273-1278.
49. Keshavaprasad, B., Liu, C., Au, J.D., Kindler, C.H., Cotten, J.F., and Yost, C.S. (2005). Species-specific differences in response to anesthetics and other modulators by the K<sub>2</sub>P channel TRESK. *Anesth Analg* 101, 1042-1049, table of contents.
50. Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., and Goldstein, S.A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376, 690-695.
51. Kimura, Y., Schmitt, A., Fukushima, N., Ishii, I., Kimura, H., Nebreda, A.R., and Chun, J. (2001). Two novel *Xenopus* homologs of mammalian LP(A1)/EDG-2 function as lysophosphatidic acid receptors in *Xenopus* oocytes and mammalian cells. *J Biol Chem* 276, 15208-15215.

52. Knowlden, S., and Georas, S.N. (2014). The autotaxin-LPA axis emerges as a novel regulator of lymphocyte homing and inflammation. *J Immunol* *192*, 851-857.
53. Lafreniere, R.G., Cader, M.Z., Poulin, J.F., Andres-Enguix, I., Simoneau, M., Gupta, N., Boisvert, K., Lafreniere, F., McLaughlan, S., Dube, M.P., *et al.* (2010). A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat Med* *16*, 1157-1160.
54. Lafreniere, R.G., and Rouleau, G.A. (2011). Migraine: Role of the TRESK two-pore potassium channel. *Int J Biochem Cell Biol* *43*, 1533-1536.
55. Leipold, E., Liebmann, L., Korenke, G.C., Heinrich, T., Giesselmann, S., Baets, J., Ebbinghaus, M., Goral, R.O., Stodberg, T., Hennings, J.C., *et al.* (2013). A de novo gain-of-function mutation in SCN11A causes loss of pain perception. *Nat Genet* *45*, 1399-1404.
56. Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. (1996). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure. *Embo J* *15*, 1004-1011.
57. Lesage, F., Lauritzen, I., Duprat, F., Reyes, R., Fink, M., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997). The structure, function and distribution of the mouse TWIK-1 K<sup>+</sup> channel. *FEBS Lett* *402*, 28-32.
58. Lesage, F., and Lazdunski, M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* *279*, F793-801.
59. Lesage, F., Maingret, F., and Lazdunski, M. (2000). Cloning and expression of human TRAAK, a polyunsaturated fatty acids-activated and mechano-sensitive K(+) channel. *FEBS Lett* *471*, 137-140.
60. Liu, C., Au, J.D., Zou, H.L., Cotten, J.F., and Yost, C.S. (2004). Potent activation of the human tandem pore domain K channel TRESK with clinical concentrations of volatile anesthetics. *Anesth Analg* *99*, 1715-1722, table of contents.
61. Liu, P., Xiao, Z., Ren, F., Guo, Z., Chen, Z., Zhao, H., and Cao, Y.Q. (2013). Functional analysis of a migraine-associated TRESK K<sup>+</sup> channel mutation. *J Neurosci* *33*, 12810-12824.
62. Lopes, C.M., Rohacs, T., Czirjak, G., Balla, T., Enyedi, P., and Logothetis, D.E. (2005). PIP2 hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K<sup>+</sup> channels. *J Physiol* *564*, 117-129.
63. Lotshaw, D.P. (2007). Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K<sup>+</sup> channels. *Cell Biochem Biophys* *47*, 209-256.



64. Maingret, F., Fosset, M., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honore, E. (1999a). TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* 274, 1381-1387.
65. Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honore, E. (1999b). Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J Biol Chem* 274, 26691-26696.
66. Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honore, E. (2000). Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem* 275, 10128-10133.
67. Marsh, B., Acosta, C., Djouhri, L., and Lawson, S.N. (2012). Leak K(+) channel mRNAs in dorsal root ganglia: relation to inflammation and spontaneous pain behaviour. *Mol Cell Neurosci* 49, 375-386.
68. Matas-Rico, E., Garcia-Diaz, B., Llebregz-Zayas, P., Lopez-Barroso, D., Santin, L., Pedraza, C., Smith-Fernandez, A., Fernandez-Llebregz, P., Tellez, T., Redondo, M., *et al.* (2008). Deletion of lysophosphatidic acid receptor LPA1 reduces neurogenesis in the mouse dentate gyrus. *Mol Cell Neurosci* 39, 342-355.
69. Mathie, A. (2007). Neuronal two-pore-domain potassium channels and their regulation by G protein-coupled receptors. *J Physiol* 578, 377-385.
70. Max, M.B., and Stewart, W.F. (2008). The molecular epidemiology of pain: a new discipline for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 7, 647-658.
71. May, A., and Goadsby, P.J. (1999). The trigeminovascular system in humans: pathophysiologic implications for primary headache syndromes of the neural influences on the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 115-127.
72. McNamara, C.R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D.M., Siemens, J., Deranian, K.L., Zhao, M., Hayward, N.J., Chong, J.A., Julius, D., Moran, M.M., *et al.* (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13525-13530.
73. Medhurst, A.D., Rennie, G., Chapman, C.G., Meadows, H., Duckworth, M.D., Kelsell, R.E., Gloger, II, and Pangalos, M.N. (2001). Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res Mol Brain Res* 86, 101-114.
74. Moskowitz, M.A. (1993). Neurogenic inflammation in the pathophysiology and treatment of migraine. *Neurology* 43, S16-20.
75. Moskowitz, M.A., and Macfarlane, R. (1993). Neurovascular and molecular mechanisms in migraine headaches. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 5, 159-177.
76. Murbartian, J., Lei, Q., Sando, J.J., and Bayliss, D.A. (2005). Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. *J Biol Chem* 280, 30175-30184.

77. Naruse, K., McGehee, D.S., and Oxford, G.S. (1992). Differential responses of Ca-activated K channels to bradykinin in sensory neurons and F-11 cells. *Am J Physiol* 262, C453-460.
78. Nieto-Posadas, A., Picazo-Juarez, G., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Morales-Lazaro, S., Escalante-Alcalde, D., Islas, L.D., and Rosenbaum, T. (2011). Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nat Chem Biol* 8, 78-85.
79. Noguchi, K., Herr, D., Mutoh, T., and Chun, J. (2009). Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Curr Opin Pharmacol* 9, 15-23.
80. Pascual, J., Caminero, A.B., Mateos, V., Roig, C., Leira, R., Garcia-Monco, C., and Lainez, M.J. (2004). Preventing disturbing migraine aura with lamotrigine: an open study. *Headache* 44, 1024-1028.
81. Patel, A.J., Honore, E., Lesage, F., Fink, M., Romey, G., and Lazdunski, M. (1999). Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K<sup>+</sup> channels. *Nat Neurosci* 2, 422-426.
82. Patel, A.J., Honore, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F., and Lazdunski, M. (1998). A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K<sup>+</sup> channel. *Embo J* 17, 4283-4290.
83. Petersen, M., Lamotte, R.H., Klusch, A., and Kniffki, K.D. (1996). Multiple capsaicin-evoked currents in isolated rat sensory neurons. *Neuroscience* 75, 495-505.
84. Platika, D., Boulos, M.H., Baizer, L., and Fishman, M.C. (1985). Neuronal traits of clonal cell lines derived by fusion of dorsal root ganglia neurons with neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 3499-3503.
85. Rajan, S., Wischmeyer, E., Karschin, C., Preisig-Muller, R., Grzeschik, K.H., Daut, J., Karschin, A., and Derst, C. (2001). THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* 276, 7302-7311.
86. Rajan, S., Wischmeyer, E., Xin Liu, G., Preisig-Muller, R., Daut, J., Karschin, A., and Derst, C. (2000). TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K<sup>+</sup> channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J Biol Chem* 275, 16650-16657.
87. Reyes, R., Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Salinas, M., Farman, N., and Lazdunski, M. (1998). Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K<sup>+</sup> channel from human kidney. *J Biol Chem* 273, 30863-30869.
88. Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Kitada, C., Yokoi, H., Nozawa, K., Okada, H., Matsushime, H., and Furuichi, K. (2003). A novel two-pore domain K<sup>+</sup> channel, TRESK, is localized in the spinal cord. *J Biol Chem* 278, 27406-27412.
89. Sehgal, S.A., Hassan, M., and Rashid, S. (2014). Pharmacoinformatics elucidation of potential drug targets against migraine to target ion channel protein KCNK18. *Drug Des Devel Ther* 8, 571-581.

90. Sevastou, I., Kaffe, E., Mouratis, M.A., and Aidinis, V. (2012). Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: the PLA(2)/LPC and ATX/LPA axes. *Biochim Biophys Acta* 1831, 42-60.
91. Sirois, J.E., Lei, Q., Talley, E.M., Lynch, C., 3rd, and Bayliss, D.A. (2000). The TASK-1 two-pore domain K<sup>+</sup> channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics. *J Neurosci* 20, 6347-6354.
92. Sirois, J.E., Lynch, C., 3rd, and Bayliss, D.A. (2002). Convergent and reciprocal modulation of a leak K<sup>+</sup> current and I(h) by an inhalational anaesthetic and neurotransmitters in rat brainstem motoneurons. *J Physiol* 541, 717-729.
93. Sisignano, M., Angioni, C., Ferreiros, N., Schuh, C.D., Suo, J., Schreiber, Y., Dawes, J.M., Antunes-Martins, A., Bennett, D.L., McMahon, S.B., *et al.* (2013). Synthesis of lipid mediators during UVB-induced inflammatory hyperalgesia in rats and mice. *PLoS One* 8, e81228.
94. Stewart, W.F., Ricci, J.A., Chee, E., Morganstein, D., and Lipton, R. (2003). Lost productive time and cost due to common pain conditions in the US workforce. *Jama* 290, 2443-2454.
95. Tigyi, G. (2012). Lipids: LPA activates TRPV1--and it hurts. *Nat Chem Biol* 8, 22-23.
96. Tokumura, A. (2004). Metabolic pathways and physiological and pathological significances of lysolipid phosphate mediators. *J Cell Biochem* 92, 869-881.
97. Tulleuda, A., Cokic, B., Callejo, G., Saiani, B., Serra, J., and Gasull, X. (2011). TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Mol Pain* 7, 30.
98. Ueda, H. (2006). Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacol Ther* 109, 57-77.
99. Waxman, S.G., and Zamponi, G.W. (2014). Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nat Neurosci* 17, 153-163.
100. Wright, P.D., Weir, G., Cartland, J., Tickle, D., Kettleborough, C., Cader, Z., and Jerman, J. (2013). Cloxyquin (5-Chloroquinolin-8-ol) is an activator of the two-pore domain potassium channel TRESK. *Biochem Biophys Res Commun*.
101. Ye, X., Hama, K., Contos, J.J., Anliker, B., Inoue, A., Skinner, M.K., Suzuki, H., Amano, T., Kennedy, G., Arai, H., *et al.* (2005). LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature* 435, 104-108.
102. Ye, X., Skinner, M.K., Kennedy, G., and Chun, J. (2008). Age-dependent loss of sperm production in mice via impaired lysophosphatidic acid signaling. *Biol Reprod* 79, 328-336.

103. Yellen, G., Jurman, M.E., Abramson, T., and MacKinnon, R. (1991). Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K<sup>+</sup> channel. *Science* 251, 939-942.
104. Yoo, S., Liu, J., Sabbadini, M., Au, P., Xie, G.X., and Yost, C.S. (2009). Regional expression of the anesthetic-activated potassium channel TRESK in the rat nervous system. *Neurosci Lett* 465, 79-84.
105. Yuan, J., Matsuura, E., Higuchi, Y., Hashiguchi, A., Nakamura, T., Nozuma, S., Sakiyama, Y., Yoshimura, A., Izumo, S., and Takashima, H. (2013). Hereditary sensory and autonomic neuropathy type IID caused by an SCN9A mutation. *Neurology* 80, 1641-1649.
106. Zhou, J., Yang, C.X., Zhong, J.Y., and Wang, H.B. (2013). Intrathecal TRESK gene recombinant adenovirus attenuates spared nerve injury-induced neuropathic pain in rats. *Neuroreport* 24, 131-136.
107. Zhou, X.L., Vaillant, B., Loukin, S.H., Kung, C., and Saimi, Y. (1995). YKC1 encodes the depolarization-activated K<sup>+</sup> channel in the plasma membrane of yeast. *FEBS Lett* 373, 170-176.

## VIII. Anhang

### Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb möchte ich mich hier bei allen Menschen bedanken, die mich auf meinem Weg begleitet und unterstützt haben

Zuallererst möchte ich mich bei **Prof. Dr. Erhard Wischmeyer** für die Möglichkeit der Bearbeitung und die große Unterstützung bei der Durchführung dieses interessanten Projekts bedanken. Danke für die stets guten Ratschläge und Hilfestellungen, die zum Gelingen dieser Arbeit geführt haben.

Ein herzlicher Dank geht ebenfalls an **PD Dr. Frank Döring** für die Unterstützung bei diesem Projekt, die zum Gelingen dieser Arbeit einen großen Beitrag geleistet hat. Insbesondere für die methodische Betreuung, die wissenschaftlichen Ratschläge und Diskussion meiner Ergebnisse, die diese Arbeit stets unterstütz und vorangebracht haben.

Ich danke **Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch** für die Bereitschaft als zweiter Gutachter meines Promotionskomitees zu agieren. Vielen Dank auch für Büro- und Laborräume, die ich während der Bearbeitung meines Projekts nutzen konnte.

Vielen Dank an **Prof. Dr. Karl Mertens** für die Betreuung meiner Arbeit als dritter Gutachter meines Promotionskomitees und die stets erfrischenden Gespräche bei den jährlichen Meetings und diversen GK-Tagungen.

Ich danke **Prof. Dr. Paul Pauli, Roswitha Gerhard** und dem gesamten **GK Emotions** für die schöne, erfahrungsreiche Zeit und den „Blick über den eigenen Tellerrand“. Der GK war für mich eine tolle Erfahrung, die ich nicht missen will.

Danke auch an die **GSLs** der Universität Würzburg für das abwechslungsreiche und gut strukturierte Programm, dass einen gezielt bis zur Promotion führt.

Vielen lieben Dank auch an **Katharina Gerber** für die Unterstützung im Labor sowie die stets gute Laune und herzliche Arbeitsatmosphäre.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Mädels **Wassilina Bausenwein**, **Miriam Huth**, **Vera Scheckenbach**, **Susanne Pätzold** und **Thekra Jaziri** für eure seelische Unterstützung ob ganz aus der Nähe oder auch aus der Ferne. Durch euch schöpfe ich immer wieder neue Energie. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Ganz besonders danke ich auch meinem Freund **Maximilian Roos**, der mir stets den Rücken frei gehalten hat und mich in jeder Hinsicht unterstütz hat. Danke, dass du mich auch in angespannter und gestresster Laune ertragen hast und immer an meiner Seite bist!

Und nicht zuletzt danke ich meiner Familie. Danke an meine Schwester **Leonie** und meinen Bruder **Jens**, die mich schon mein Leben lang begleiten und prägen, sowie meinem Vater **Erich Kollert**. Ganz besonders danke ich meiner Mutter **Dagmar Eichfelder**, auf die ich immer zählen kann und die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt hat.

## Publikationsliste

### Publikationen:

**Kollert S**, Dombert B, Döring F, Wischmeyer E (2015). Activation of TRESK channels by the inflammatory mediator lysophosphatidic acid balances nociceptive signalling. Scientific Reports, in revision.

Karabeg MM, Grauthoff S, **Kollert SY**, Weidner M, Heiming RS, Jansen F, Popp S, Kaiser S, Lesch KP, Sachser N, Schmitt AG, Lewejohann L (2013). 5-HTT deficiency affects neuroplasticity and increases stress sensitivity resulting in altered spatial learning performance in the Morris water maze but not in the Barnes maze. PLoS One. 8(10):e78238. doi: 10.1371.

### Posterpräsentationen:

**Kollert S**, Döring F, Wischmeyer E (2013). Lysophosphatidic acid activates spinal nerve TRESK background potassium channels. Proceedings of the 10th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, T6-8D.

Friedrich M, Wischmeyer E, Geiger D, Groß-Lesch S, **Kollert S**, Koepsell H, Klein M, Franke B, Lesch KP, Döring F (2014). Loss of function mutation in glucose sensor SGLT3: possible association with ADHD. Proceedings of the World Congress of Psychiatric Genetics.

**Kollert S**, Döring F, Wischmeyer E (2014). Co-activation of TRESK and TRP channels by lysophosphatidic acid balances nociceptive signalling during inflammation. Proceedings of the Society for Neuroscience Meeting 2014, 299.31.

**Kollert S**, Dombert B, Döring F, Wischmeyer E (2015). Activation of TRESK channels by lysophosphatidic acid balances nociceptive signalling during inflammation. Proceedings of the 11th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, T6-2A.

## Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Name: Sina Yvonne Elfriede Kollert  
 Geburtsdaten: 16. Oktober 1985 in Würzburg

### Schulische und akademische Ausbildung

Januar 2012 - heute	Doktorandin an der Graduate School of Life Sciences an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, RTG 1253/2 GK „Emotions“
Oktober 2005 – April 2011	<p>Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg</p> <p>Diplomprüfung in:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Neurobiologie (Hauptfach): Note „sehr gut“</li> <li>– Genetik (Nebenfach): Note „sehr gut“</li> <li>– Zell- und Entwicklungsbiologie (Nebenfach): Note „sehr gut“</li> <li>– Titel der Diplomarbeit: „Establishment of immediate early gene imaging for the analysis of neural activity in the brain of 5-HTT deficient mice after their exposure to different learning tests.“ (Note „sehr gut“)</li> </ul>
September – Oktober 2009	<p>Praktikum am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg, Abteilung Molecular Neurobiology</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Titel des Projekts: „Charakterisierung und Rolle des CD95/CD95L-Systems in Tumor initiierten Zellen gewonnen aus Glioblastomgewebe.“</li> </ul>
September 1996 – Juni 2005	<p>Wirsberg Gymnasium Würzburg</p> <p>Abschluss: Abitur (Note 2,2) im Schulversuch Europäisches Gymnasium</p>



**Künftige Pläne**

heute – Dezember 2015	wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Molekulare Elektrophysiologie (Prof. Dr. E. Wischmeyer) an der Universität Würzburg
Juni 2015	Dozentin bei der DAAD Summer School “Fundamentals of Electrophysiology” an der Universiti Sains Malaysia
Juli – September 2015	Praktikum am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Molecular Biology of Neuronal Signals in Göttingen zur Erweiterung meines Methodenspektrums
Januar – Dezember 2016	Postdoc-Stipendium des Frauenbüros der Universität Würzburg: “G-Protein gekoppelte einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle – die molekulare Basis von Schmerz, Angst und Herzrhythmus-störungen” an der Universität Würzburg

**Fremdsprachen**

Latein:	großes Latinum
Englisch:	fließend
Französisch:	Grundkenntnisse

**Mitgliedschaft**

Januar – Dezember 2014	Mitglied der Society for Neuroscience, USA
------------------------	--

**Auszeichnung**

September 2014	Neuroscience Research Award der Graduate School of Life Sciences der Universität Würzburg
----------------	---

Würzburg, 29.05.15	Sina Kollert .....
--------------------	--------------------

## Affidavit/Eidesstattliche Erklärung

### Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Potassium channels of the K2P-family control the activity of neuronal cells - TRESK as regulator of inflammatory hyperalgesia“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Wuerzburg, 29.05.15

Place, Date

Signature

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Kaliumkanäle der K2P-Familie kontrollieren die Aktivität neuronaler Zellen - TRESK als Regulator inflammatorischer Hyperalgesie“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 29.05.15

Ort, Datum

Unterschrift