

Aus dem Institut für Physiologie
der Universität Würzburg
- Lehrstuhl für Physiologie II -
Vorstand Prof. Dr. Andreas Karschin

**Untersuchungen zur Interaktion des Inhalationsanästhetikums Halothan mit
K⁺-Kanälen mit zwei Porendomänen**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Katharina Barbara Oehrlein
aus Schweinfurt
Würzburg, Oktober 2006

Referent : Prof. Dr. Andreas Karschin

Koreferent: Prof. Dr. Michael Herbert

Dekan: Prof. Dr. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung : 27.07.2007

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1 Einleitung.....	1
1.1 Inhalationsanästhetika.....	1
1.1.1 Wirkstoffe.....	1
1.1.2 Wirkungen und Nebenwirkungen der Inhalationsnarkose am Beispiel von Halothan.....	3
1.1.3 Theorien zur Wirkungsvermittlung.....	5
1.2 K⁺-Kanäle mit zwei Porendomänen.....	9
1.2.1 Struktur.....	10
1.2.2 Klassifikation.....	10
1.2.3 Physiologische und elektrophysiologische Eigenschaften der 2PD-K ⁺ - Kanäle.....	11
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Molekularbiologische Methoden.....	15
2.1.1 Molekularbiologische Methoden, eingesetzte Bakterienstämme, Medien, Lösungen und Puffer.....	15
2.1.2 cDNA-Klone.....	16
2.1.3 Transformation.....	16
2.1.4 Isolierung der Plasmid-DNA.....	16
2.1.5 In vitro-Transkription.....	17
2.2 Elektrophysiologische Methoden.....	19

2.2.1 Für elektrophysiologische Messungen verwendete Substanzen und Lösungen.....	19
2.2.2 Vorbereitung der Xenopus-Oozyten.....	20
2.2.3 Methode der zwei-Elektroden-Spannungsklemme an Xenopus Oozyten.	21
2.2.4 Messaufbau.....	22
2.2.5 Herstellung der Mikroelektroden.....	26
2.2.6 Messprotokolle.....	26
2.2.7 Applikation der Perfusionslösungen.....	27
2.3 Auswertung der Daten.....	29
2.3.1 Statistik.....	29
2.3.2 Ermittlung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung.....	29
2.3.3 Berechnung von Abfall- und Anstiegszeitkonstante der Kanalaktivierung bzw. -inhibition.....	30
2.3.4 Graphische Darstellung.....	30
3 Ergebnisse.....	32
3.1 Wirkung von Halothan auf die einzelnen Subfamilien der 2PD-K+-Kanäle.....	32
3.2 Charakterisierung einer Bindungsstelle für Halothan.....	39
3.2.1 Identifikation eines 6-Aminosäuren-Motivs am Kanal TASK-1 mit kritischer Bedeutung für die Halothan-vermittelte Aktivierung.....	39
3.2.2 Untersuchung der Rolle einer hydrophoben Bindungstasche bei der Akti- vierung des Kanals TREK-1 durch Halothan.....	44
3.3 Bedeutung verschiedener Signalwege und Regulationsfaktoren für die Ver- mittlung der Halothanwirkung auf 2PD-K+-Kanäle.....	48
3.3.1 Bedeutung der durch Neurotransmitter vermittelten Gq/11-abhängigen In- hibition für die Halothanwirkung an TASK-Kanälen.....	48
3.3.2 Einfluss der Ca ⁺⁺ -Homöostase auf den Effekt von Halothan auf verschie- dene 2PD-K+-Kanäle.....	51
3.3.3 Der extrazelluläre pH-Wert und die Halothanwirkung auf TASK-1.....	53
3.4 Aktivierung und Inhibierung der 2PD-K+-Kanäle durch Halothan.....	55

3.4.1 Konzentrationsabhängig entgegengesetzte Effekte von Halothan auf die 2PD-K+-Kanäle der TASK Familie.....	55
3.4.2 Inhibition von TREK-1 durch Halothan nach Austausch bestimmter Aminosäuren.....	58
4 Diskussion.....	59
4.1 Molekulare Grundlagen der Wirkung von Anästhetika auf die 2PD-K+-Kanäle	59
4.1.1 Halothan-vermittelte Aktivierung von TASK-1 und TASK-3 über eine Gate-Struktur.....	59
4.1.2 Identifikation mehrerer an der Aktivierung durch Halothan beteiligter Proteinabschnitte bei TREK-1.....	63
4.2 Die 2PD-K+-Kanäle als Zielstruktur der Inhalationsanästhetika.....	68
4.2.1 Klinische Relevanz der 2PD-K+-Kanäle für die Narkose.....	68
4.2.2 Konsequenzen einer Beteiligung von 2PD-K+-Kanälen an der Narkosewirkung für die Klinik.....	70
5 Zusammenfassung.....	74
6 Literaturverzeichnis.....	76
7 Anhang.....	85
7.1 Charakteristische Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten 2PD-K+-Kanäle.....	85
7.2 Gewebsexpression der 2PD-K+-Kanäle.....	87

Abkürzungen und Symbole

Δ	Deletion
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAPTA	1,2-bis(2-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EC_x	Effektiv-Konzentration (x% des maximalen Effektes)
EEG	Elektroenzephalografie
GABA	γ-aminobutyric acid, γ-Aminobuttersäure
HEPES	Hydroxymethyl-aminomethan-N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan-sulfonat
MOPS	(4-(N-Morpholino)propan)sulfonsäure
cRNA	messenger-RNA
NaAc	Natrium-Acetat
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
pA	Picoampère
pO₂ / pCO₂	Partialdruck von Sauerstoff/Kohlendioxid
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
SD	Standardabweichung
Tris	Tris/Hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
Vol	Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Die Abkürzung der Aminosäuren erfolgt im Einbuchstabencode.

Grundsätzlich werden die international üblichen Abkürzungen der SI-Einheiten verwendet.

Alle weiteren Abkürzungen werden im Text erklärt.

1 Einleitung

1.1 Inhalationsanästhetika

Anästhetika sind Medikamente, die dazu verwendet werden, das Bewusstsein kurz-, mittel- oder langfristig auszuschalten. Entsprechend der Applikationsform unterscheidet man Injektionsanästhetika, verwendet zur intravenösen Narkoseeinleitung, zur Kurznarkose oder für die sog. Neuroleptanästhesie, von der Gruppe der Inhalationsanästhetika.

Diese Pharmaka werden mittels spezieller Verdampfer über die Atemluft verabreicht und liegen deshalb bei Raumtemperatur völlig (Gase) oder teilweise (Flüssigkeiten mit einem hohen Sättigungsdampfdruck) in gasförmigem Aggregatzustand vor. Sie gelangen über die Lungenbläschen (Alveolen) ins Blut und von dort unter anderem ins zentrale Nervensystem, ihrem eigentlichen Wirkort.

1.1.1 Wirkstoffe

Die Inhalationsanästhetika lassen sich grob in drei Gruppen untergliedern (Forth *et al.*, 1996, S. 232, Kretz *et al.*, 2000, S. 79-93). Ihnen gemeinsam ist neben einem ähnlichen Wirkungsprofil (s.u.) eine deutliche Lipophilie. Diese für die Wirkung eines Inhalationsanästhetikums entscheidende Eigenschaft beruht auf der charakteristischen chemischen Struktur dieser Substanzen. Im Vergleich werden die Gemeinsamkeiten in Struktur und Größe deutlich: kleine, ständige Dipole, keine Aromaten und fehlende starke Wasserstoffbrückenbindung-Akzeptoren bzw. -donoren (Eckenhoff, 2001) (s. Abb. 1.1).

Halogenierte Ether

Dazu gehören neben dem *Diethylether*, das nur noch historische Bedeutung hat, die in den 70er und 80er Jahren im Handel eingeführten Substanzen *Enfluran*, *Isofluran*, *Sevofluran* und *Desfluran*.

Halogenierte Kohlenwasserstoffe

Einzige in der Klinik relevante Substanz dieser Klasse ist das Halothan (*2-Bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoethan*) mit sehr guter narkotischer, aber kaum analgetischer

1 Einleitung

Wirkung. *Chloroform* wird aufgrund seiner ausgeprägten nephro- und hepatotoxischen Nebenwirkungen in der Klinik nicht mehr verwendet und besitzt nur noch theoretische bzw. toxikologische Bedeutung.

Anorganische Gase

Stickoxydul (N_2O , Lachgas), besitzt eine ausgesprochen gute analgetische, aber kaum hypnotische Wirkung. Es wird in der Regel bei Inhalationsnarkosen dem Sauerstoff im Inspirationsgemisch beigefügt. Das Edelgas Xenon kann aufgrund seiner narkotischen und analgetischen Eigenschaften ebenfalls zur Narkose verwendet werden.

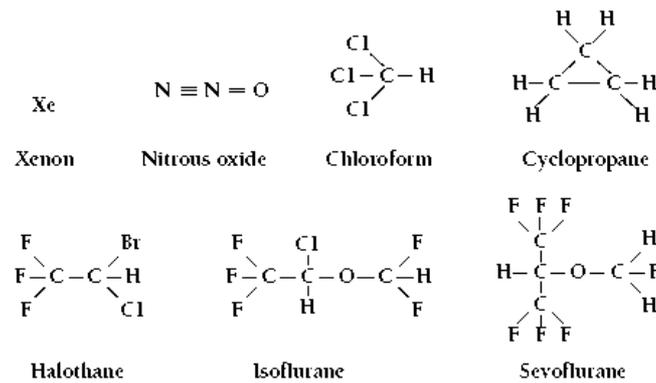


Abb. 1.1: Strukturformel ausgewählter Inhalationsanästhetika (Eckenhoff, R.G, 2001).

1.1.2 Wirkungen und Nebenwirkungen der Inhalationsnarkose am Beispiel von Halothan

Entsprechend der klinischen Definition ist eine Narkose das Fehlen einer Muskelreaktion auf einen Schmerzreiz (American Board of Anesthesiology, 1998). Dieser als Bewusstlosigkeit bezeichnete Zustand resultiert aus der immobilisierenden, hypnotischen und amnestischen Wirkung von Anästhetika wie Halothan.

Nach seiner Entwicklung in den 50er Jahren war Halothan lange Zeit das am häufigsten eingesetzte Narkosemittel. Aufgrund der aufwändigeren Handhabung der chemisch relativ instabilen Substanz, vor allem aber wegen des ungünstigeren Nebenwirkungsprofils (s.u.) und der längeren An- bzw. Abflutungszeiten wird Halothan seit Einführung der neueren halogenierten Ether im Klinikalltag kaum noch verwendet.

Halothan löst reversibel eine Ausschaltung des Bewusstseins, eine Dämpfung vegetativer Reflexe und die Ausschaltung der Willkürmotorik aus. Das sog. Toleranzstadium, d.h. die völlige Bewusstlosigkeit, in der operative Eingriffe durchgeführt werden können, wird nach wenigen Minuten erreicht. Die analgetische Wirkung von Halothan ist, wie bei den anderen Inhalationsanästhetika auch, sehr gering.

Bei Verwendung von Inhalationsanästhetika wie Halothan muss v.a. mit kardiovaskulären und respiratorischen Nebenwirkungen gerechnet werden. Halothan setzt die Sensitivität des Atemzentrums der *Medulla oblongata* herab. Das Atemminutenvolumen sinkt, sodass der Patient während der Narkose maschinell beatmet werden muss. Ein Vorteil des Halothans gegenüber den anderen

1 Einleitung

Substanzen ist seine bronchodilatatorische Wirkung. Der Einsatz bei Patienten mit Asthma oder anderen obstruktiven Atemwegserkrankungen bietet sich daher an.

Der häufig beobachtete dosisabhängige Blutdruckabfall, mit dem Risiko eines Kreislaufversagens bereits bei narkotischer Dosis, ist im Fall von Halothan v.a. Folge seiner kardiodepressiven Wirkung: Halothan wirkt am Herzen über eine verlängerte Öffnungszeit der Ca^{++} -Kanäle des sarkoplasmatischen Retikulums negativ inotrop und steigert außerdem den zentralen Parasympathikotonus. Zusätzlich kommt es zu einer direkten Relaxation der Muskulatur peripherer Gefäße und zur Senkung des zentralen Sympathotonus. Da die Empfindlichkeit des Myokards gegenüber Katecholaminen zunimmt, kommt es unter Halothan relativ häufig zu Herzrhythmusstörungen.

Im Gegensatz zu den anderen Inhalationsanästhetika verursacht Halothan nur geringe Veränderungen der im EEG ableitbaren elektrischen Aktivität des ZNS. Die zerebrale Perfusion und der intrakranielle Druck werden nicht beeinflusst.

Die sog. maligne Hyperthermie, eine gefürchtete und in 30 % der betroffenen Fälle tödlich endende Nebenwirkung der Inhalationsanästhetika, ist bei Anwendung von Halothan, ebenso wie bei den anderen Substanzen dieser Klasse, sehr selten (1:50.000). Bei Patienten mit einer genetisch bedingten Ca^{++} -Transportstörung im Sarkoplasma kommt es nach Verabreichung von Inhalationsanästhetika oder Muskelrelaxantien zu einer exzessiven Freisetzung von Ca^{++} -Ionen. Die Folgen sind Kontraktion der Skelettmuskulatur, Temperaturanstieg bis $> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$, Azidose und Hyperkaliämie.

V.a. wegen seiner lebertoxischen Nebenwirkung wird Halothan kaum noch verwendet. In 1:10.000 Fällen kommt es durch den vor allem unter hypoxischen Bedingungen gebildeten reaktiven Halothan-Metaboliten Carben, möglicherweise aber auch allergisch bedingt, zu Leberfunktionsstörungen mit Ikterus und Leberzellnekrose mit u.U. tödlichem Ausgang.

Eine Verminderung von Insulinsekretion und -sensitivität, eine Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion sowie eine Verminderung der zellulären Immunität aufgrund einer Funktionseinschränkung der neutrophilen Granulozyten werden außerdem diskutiert. Ein gentoxischer Effekt wurde den Inhalationsanästhetika nachgewiesen, spielt aber in der Klinik bei sachgemäßer Anwendung dieser Substanzen keine Rolle.

1.1.3 Theorien zur Wirkungsvermittlung

Auch über 150 Jahre nach Durchführung der ersten erfolgreichen Vollnarkose ist unbekannt, welche Mechanismen der Wirkung der Inhalationsanästhetika zugrunde liegen.

Overton und Mayer zeigten zu Beginn des 20. Jahrhunderts eine starke direkte Korrelation zwischen der Lipophilie eines Inhalationsanästhetikums und seiner pharmakologischen Potenz. Die Aufmerksamkeit richtet sich seither v.a. auf die Lipidmembran von Nervenzellen und die darin integrierten Strukturen (Franks N.P. *et al.*, 1994).

Die steil ansteigende Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Inhalationsanästhetika mit ihrem in allen untersuchten Populationen hochkonservierten Verlauf (Abb. 1.2) spricht gegen ein einzelnes molekulares Korrelat dieser Wirkung. Bei Beteiligung eines einzigen Rezeptors wäre aufgrund von Rezeptorpolymorphismen und anderen Variablen eine wesentlich flachere Kurve zu erwarten, die in verschiedenen Populationen unterschiedlich verläuft. Der klinische EC_{50} (Effektiv-Konzentration, 50% des maximalen Effektes) liegt mit Werten im mM-Bereich 10^3 - 10^6 fach über dem EC_{50} von Wirkstoffen, die bekanntermaßen über einen einzelnen Rezeptor wirken (Eckenhoff, R.G., 2001; Franks N.P. *et al.* 1994; Johansson, 1998).

In Bindungsanalysen in ZNS-Gewebe zeigte sich kein rezeptorspezifisches Verteilungsmuster, Inhalationsanästhetika binden hier ubiquitär bevorzugt in Bereichen hoher synaptischer Dichte (Eckenhoff M.F. *et al.*, 1998). Vermutlich existieren unterschiedliche selektive Zielstrukturen, die in den einzelnen Kompartimenten über verschiedene Signalwege letztlich zu ein und dem selben Effekt führen: der Narkose (Eckenhoff R.G., 2001, Mashour *et al.*, 2005).

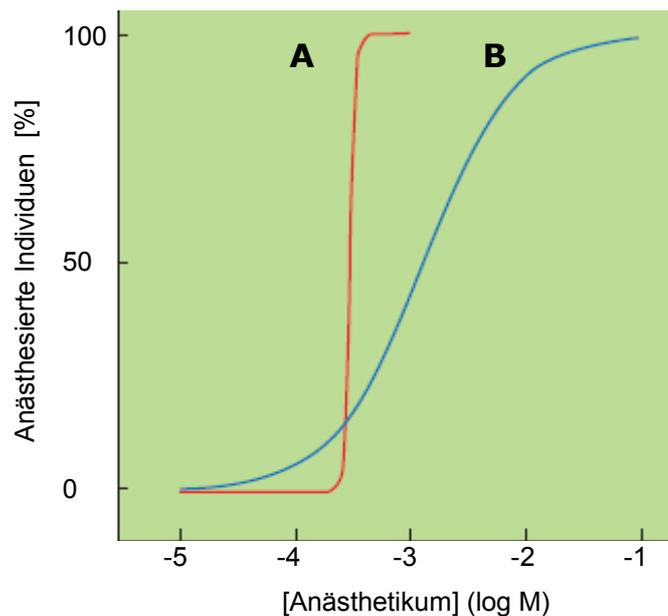


Abb. 1.2: Dosis-Wirkungs-Beziehung einer *in vivo* Narkose (A) und typischer Aktivierungsverlauf eines einzelnen Rezeptors *in vitro* (B) (Eckenhoff, R.G., 2001). Verglichen mit der Kurve der Rezeptoraktivierung (Hill-Koeffizient ≈ 1) zeigt die Dosis-Wirkungs-Beziehung der Narkose einen sehr steilen Verlauf (Hill-Koeffizient ≈ 20). Selbst hoch-affine Enzyme oder Rezeptoren zeigen bei ihrer Liganden-Bindung selten Hill-Koeffizienten größer als 3.

Die moderne Lipidtheorie kombiniert die Vorstellung einer selektiven Bindung mit der von Overton und Mayer postulierten Theorie einer globalen Dämpfung des ZNS durch unspezifische Einlagerung der Wirkstoffe in Lipidmembranen. Sie beruht im Wesentlichen auf neueren Erkenntnissen über die Komplexität der Lipidmembranen und deren Einfluss auf die Konformation und die Funktion der darin eingebetteten Proteine (Mashour *et al.*, 2005). Die Anästhetika-Moleküle lagern sich bevorzugt in den amphiphilen Bereichen der Lipidmembran ein (Koubi *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2002). Sie verschieben dort nicht nur mechanisch das Druckprofil innerhalb der Membran und verändern deren Fließeigenschaften, sondern beeinflussen auch die Ausrichtung der dipolaren Lipide und damit das elektrische Profil der Membranoberfläche (Cantor, 2001). Effekte auf die Funktion von Membranproteinen und damit auch auf das Verhalten von Ionenkanälen können so erklärt werden (Cantor, 2001; Koubi *et al.*, 2001). Die Potenz eines Narkotikums würde demnach nicht nur durch seine Konzentration in der Lipidmembran bestimmt, sondern auch durch dessen molekulare Eigenschaften.

Anästhetika konzentrieren sich in hydrophoben Taschen oder Spalten von löslichen und membrangebundenen Proteinen. Enzyme, Rezeptoren, Carrier-Proteine,

ligandenabhängige wie auch spannungsgesteuerte Ionenkanäle und sogar Strukturproteine interagieren in unterschiedlicher Art und Weise mit Inhalationsanästhetika (Dilger, 2002; Eckenhoff M.F. *et al.*, 2002; Eckenhoff R.G. *et al.*, 1997, Eckenhoff R.G., 2001; Franks N.P. *et al.*, 1994; Rudolph *et al.*, 2004). Vor allem ligandenabhängige Ionenkanäle scheinen gegenüber Inhalations- wie auch gegenüber Injektionsanästhetika in den klinisch relevanten Konzentrationen besonders sensitiv zu sein.

Seit langem ist bekannt, dass Inhalationsanästhetika über eine Hyperpolarisierung neuronaler Membranen deren Erregbarkeit bzw. deren spontane Aktivität vermindern (Nicoll *et al.*, 1982). Inhalationsanästhetika steigern die durch die Neurotransmitter GABA bzw. Glycin aktivierten hyperpolarisierenden Cl⁻-Ströme signifikant und setzen dadurch die Erregbarkeit von Neuronen herab. Analog dazu hemmen sie depolarisierende Ströme, die durch Serotonin, Glutamat oder auch Acetylcholin vermittelt werden. Anästhetika beeinflussen aber auch die Aktivität nicht rezeptorgebundener Na⁺-, Ca⁺⁺- oder K⁺-Kanäle (Tab. 1.1) (Dilger, 2002; Franks N.P. *et al.*, 1994; Mashour *et al.*, 2005; Miller, 2002).

<i>Zielstruktur</i>	<i>Effekt</i>	<i>Wirkung (zellulär)</i>	<i>Betroffene Funktionen</i>
Spannungsgesteuerte Na⁺-Kanäle	-	Unterdrückung von Aktionspotenzialen	Nervenleitungsgeschwindigkeit
Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren (neuronal und muskulär)	-	Inhibition der Neurotransmitter-ausschüttung	Gedächtnis, Nozizeption, autonome Regulation, neuromuskuläre Transmission
Glutamat-Rezeptoren	-	Inhibition der Depolarisation	Aufmerksamkeit, Lernen, Gedächtnis, Nozizeption
GABA_A-Rezeptoren	+	Hyperpolarisation	Aktivitätsniveau (Anxiolyse, Sedation), Gedächtnis, Muskeltonus
Glycin-Rezeptoren	+	Hyperpolarisation	Spinale Reflexe, startle response
2PD-K⁺-Kanäle	+/-	Modulation von Ruhepotenzial und Erregbarkeit neuronaler Membranen	unspezifisch, global

Tab. 1.1 Wichtige Zielstrukturen der Anästhetikawirkung (modifiziert nach Mashour *et al.*, 2005)
(-) Inhibition, (+) Aktivierung.

Der beobachteten Hyperpolarisation liegt auch eine gesteigerte K⁺-Leitfähigkeit zu Grunde (Franks N.P. *et al.*, 1988; Ries *et al.*, 1999; Sirois *et al.*, 1998; Winegar *et al.*, 1996). Diese Leitfähigkeit wird durch Kalium-Kanäle mit zwei Porendomänen vermittelt (Talley *et al.*, 2000), die durch zahlreiche Anästhetika in ihrer Funktion

1 Einleitung

beeinflusst werden können (Gruss *et al.*, 2004; Lesage, 2003; Liu *et al.*, 2004). Ihre Rolle bei der Wirkung von Inhalationsanästhetika soll in dieser Arbeit unter Berücksichtigung der beschriebenen Wirktheorien genauer untersucht werden.

1.2 K⁺-Kanäle mit zwei Porendomänen

Die größte Gruppe unter den Ionenkanälen bilden die K⁺-Kanäle. K⁺-Kanäle sind Proteinkomplexe aus mehreren hydrophoben Untereinheiten, die in biologischen Membranen K⁺-selektive Poren bilden und so den passiven Transport von K⁺ durch die Membran ermöglichen. Sie finden sich im menschlichen Organismus in jeder einzelnen Zelle und spielen eine wichtige Rolle, nicht nur bei der Regulation der K⁺-Homöostase und des Zell-Volumens, sondern auch bei allen vom Membranpotenzial abhängigen Funktionen, wie z.B. neuronaler und muskulärer Erregung oder auch Sekretion von Hormonen und Neurotransmittern (Doyle *et al.*, 1998; Hille, 1992).

Bei den Säugern werden diese Kanäle entsprechend ihrer Membrantopologie in drei Untergruppen eingeteilt (Gutman *et al.*, 2003): Zum einen Kalium-Kanäle, deren Untereinheiten aus sechs Transmembrandomänen sowie einer Poren-Domäne bestehen (6TMS/1P). Hierzu zählen u.a. die spannungsgeschalteten (Kv) und die Ca⁺⁺-abhängigen K⁺-Kanäle (K_{ca}). Die zweite Untergruppe bilden die K⁺-Kanäle, die aus Untereinheiten mit einer Poren-Domäne und lediglich zwei Transmembrandomänen bestehen (2TMS/1P). Zu dieser Untergruppe gehören die einwärtsgleichrichtenden (Kir) und die ATP-sensitiven (K_{ATP}) K⁺-Kanäle. Jeweils vier Untereinheiten bilden dabei ein homo- bzw. heterotetrameres Membranprotein, die eigentliche „Pore“. Die Poren-Domänen enthalten den Selektivitätsfilter, der spezifisch den K⁺-Transport ermöglicht, und bei allen diesen Kanälen hochkonserviert das Aminosäuren-Motiv T_G_G besitzt (Doyle *et al.*, 1998).

Auf der Grundlage dieser hochselektiven Aminosäuresequenz wurde 1995 bei der Analyse verschiedener Prokaryotengenome die dritte Untergruppe der K⁺-Kanäle entdeckt, die sog. K⁺-Kanäle mit zwei Porendomänen (K_{2PD}). In der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden Gene für eine K⁺-Kanal-Untereinheit identifiziert, die neben zwei Porendomänen acht Transmembrandomänen besitzt: *TOK1*, funktionell ein auswärtsgleichrichtender K⁺-Strom, für den bis heute noch kein menschliches Homolog identifiziert wurde (Buckingham *et al.*, 2005; Ketchum *et al.*, 1995). Im selben Jahr fand man Gene für ähnliche Untereinheiten bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Goldstein *et al.*, 1996) und auch bei den Säugern. Die erste von mittlerweile 15 klonierten Untereinheiten dieser Gruppe bei den Säugern erhielt den Namen *TWIK-1* (Two pore weak inward rectifying K⁺ channel) (Lesage *et al.*, 1996b).

1 Einleitung

1.2.1 Struktur

Die 2PD-K⁺-Kanäle bestehen aus 307 bis 543 Aminosäuren. Ihnen gemeinsam sind die in Abb. 1.3 dargestellten Strukturmerkmale: Vier Transmembrandomänen (M1 - M4), zwei Porendomänen (P1 und P2) und auf der cytoplasmatischen Seite ein kurzer NH₂-Terminus und ein langer COOH-Terminus (Goldstein *et al.*, 2001; Karschin A., 2001).

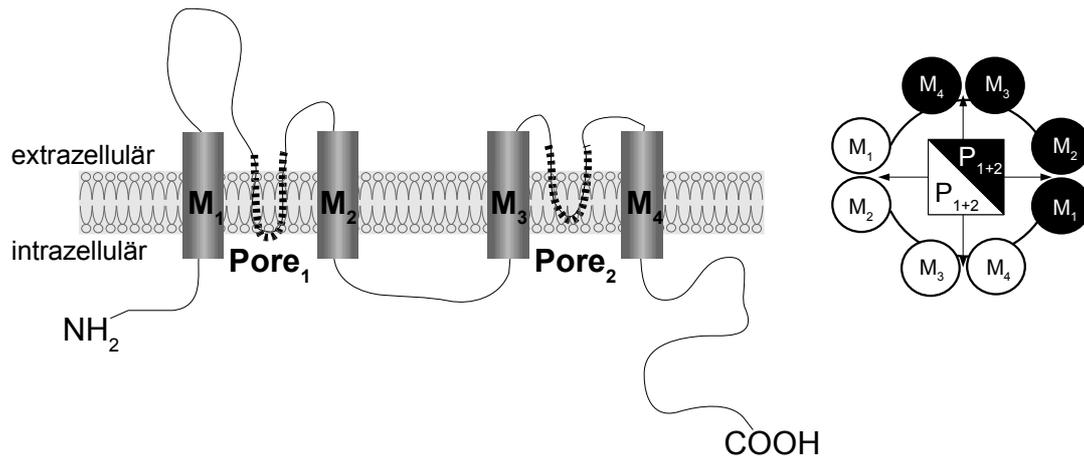


Abb.1.3: Modell eines K⁺-Kanals mit zwei Porendomänen.

Schematisch dargestellt ist die Membrantopologie einer Untereinheit in der Seitenansicht (links) und die Anordnung der beiden Untereinheiten zu einem funktionellen K⁺-Kanal in der Aufsicht rechts). Die beiden porenbildenden Abschnitte P₁ und P₂ werden von jeweils zwei transmembranären α -helikalen Segmenten M₁-M₄ flankiert.

Beide Porendomänen besitzen das für den K⁺-Selektivitätsfilter typische Motiv und sind funktionell an der Porenbildung beteiligt. Die 2PD-K⁺-Kanäle liegen als Dimere vor (Lesage *et al.*, 2000b; Reyes *et al.*, 2000; Sano *et al.*, 2003). Essentiell für die Dimerisation der beiden Untereinheiten ist der bei allen Vertretern dieser K⁺-Kanal-Familie auffallend große extrazelluläre Aminosäureabschnitt zwischen den Segmenten M1 und P1. Die Dimerisation erfolgt über Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten dieses extrazellulären Loops (Buckingham *et al.*, 2005; Chavez *et al.*, 1999; Lesage *et al.*, 1996a, 1996b).

1.2.2 Klassifikation

Bis heute wurden beim Menschen 15 Gene für 2PD-K⁺-Kanäle beschrieben. 12 dieser Gene können im heterologen System erfolgreich exprimiert werden. Die Nomenklatur dieser Gruppe von K⁺-Kanälen ist noch immer sehr uneinheitlich:

Einige Arbeitsgruppen benennen die unterschiedlichen Untereinheiten nach den entsprechenden Genen KCNK 1-17. Diese Einteilung des HGNC (*Human Genome Nomenclature Committee*) gibt lediglich die Reihenfolge der Erstbeschreibung der einzelnen Gene wieder. Die Nomenklatur der IUPHAR (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology*) vergibt diesen Kanälen in Anlehnung an die Einteilung der HGNC die Bezeichnung K_{2p} 1.1 bis 18.1. Die in dieser Arbeit verwendete Einteilung verwendet Akronyme, die sich speziell auf physiologische und pharmakologische Eigenschaften der einzelnen Kanäle beziehen. Aufgrund funktioneller und struktureller Gemeinsamkeiten werden die 2PD- K^+ -Kanäle dabei zu sechs Untergruppen zusammengefasst (Abb. 1.4).

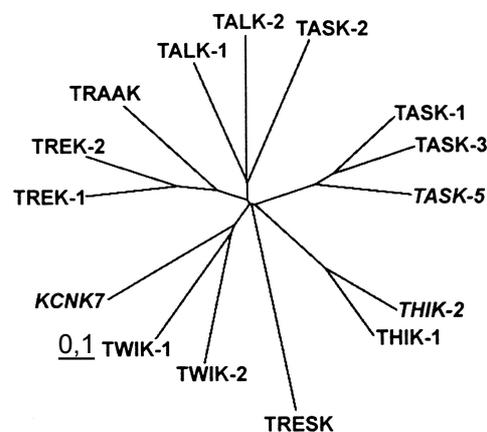


Abb. 1.4: Phylogenetischer Stammbaum der zur Zeit bekannten menschlichen 2PD- K^+ -Kanäle (Liu *et al.*, 2004).

Die 15 2PD- K^+ -Kanäle der Säugetiere werden entsprechend ihrer Sequenzhomologie in sechs Untergruppen aufgeteilt. Die kursiv hervorgehobenen Kanäle können im heterologen System bisher nicht zur Expression gebracht werden. *TALK*: TWIK-related alkaline pH-activated K^+ channel, *TASK*: TWIK-related acid-sensitive K^+ channel, *THIK*: Tandem Pore Domain Halothane-inhibited K^+ channel, *TRESK*: TWIK-related spinal cord K^+ channel, *TWIK*: Tandem of P Domains in a weak inwardly rectifying K^+ channel, *TREK*: TWIK-related K^+ channel, *TRAAK*: TWIK-related arachidonic acid-stimulated K^+ -channel.

1.2.3 Physiologische und elektrophysiologische Eigenschaften der 2PD- K^+ -Kanäle

Die durch die 2PD- K^+ -Kanäle generierten Ströme waren schon lange vor Entdeckung der entsprechenden Kanalproteine bekannt. Bereits 1952, am Beginn der zellulären elektrophysiologischen Forschung, beschrieben Hodgkin und Huxley die Existenz sog. Hintergrundleitfähigkeiten in Neuronen. Sie zeigten, dass diese Leitfähigkeit das Ruhemembranpotenzial erregbarer Membranen stabilisiert und somit auch einen wichtigen Einfluss auf die Generierung und Rückbildung von Aktionspotenzialen hat (Hodgkin *et al.*, 1952). Das Verhalten der Leckströme bei

1 Einleitung

physiologischer K^+ -Konzentration ließ sich mit der *Goldman-Hodgkin-Katz*-Stromgleichung beschreiben. Ein derartiger Ionenflux kann nur dann stattfinden, wenn die entsprechenden Ionenkanäle am Ruhepotenzial im aktiven, offenen Zustand vorliegen. Diese K^+ -Leckleitfähigkeiten können im Gegensatz zu allen anderen K^+ -Strömen durch klassische K^+ -Kanal-Blocker wie Tetraethylammonium (TEA), 4-Aminopyridin (4-AP) oder Caesium (Cs^{++}) nicht gehemmt werden und unterscheiden sich funktionell von den übrigen K^+ -Kanälen (O'Connell *et al.*, 2002).

Mit der Entdeckung der 2PD- K^+ -Kanäle konnte nun das molekulare Korrelat zu diesen Hintergrundströmen identifiziert und viele offene Fragen zu Entstehung, Eigenschaften und Regulation dieser Ströme beantwortet werden (Goldstein *et al.*, 2001; Karschin, A., 2001; Lesage *et al.*, 2000b): Wie für die Leckströme postuliert, sind diese Kanäle hochgradig K^+ -selektiv. Verändert man im Experiment die extrazelluläre K^+ -Konzentration, entsprechen die an der Membran gemessenen Umkehrpotenziale den nach der *Nernst*-Gleichung zu erwartenden Werten. Die Leckströme durch diese 2PD- K^+ -Kanäle sind außerdem zeitunabhängig, d.h. der Strom passt sich Veränderungen der Membranspannung unmittelbar ohne Zeitverzögerung an. Weder die Aktivierung noch die Inaktivierung zeigen eine relevante Kinetik. Die Spannungsunabhängigkeit dieser Ströme zeigt sich bei symmetrischen K^+ -Konzentrationen beidseits der Membran: Die Ströme verändern sich linear mit der Membranspannung. Unter physiologischen Bedingungen, d.h. niedrige K^+ -Konzentration extrazellulär bei hoher K^+ -Konzentration an der Innenseite der Zellmembran, fungieren diese Kanäle als Gleichrichter, leiten also den Strom präferentiell in einer Richtung über die Membran. Entsprechend ihrem Konzentrationsgefälle passieren die K^+ -Ionen unter physiologischen Bedingungen die Membran von intra- nach extrazellulär. Bei aktivem, d.h. offenem Kanal wird an der Membran folglich ein auswärts gerichteter Strom gemessen. Für andere K^+ -Konzentrationen lässt sich das nicht-lineare Verhalten des Stroms bei sich ändernden Spannungswerten über der Membran gemäß der *Goldman-Hodgkin-Katz*-Gleichung beschreiben (Goldstein *et al.*, 2001).

Das funktionelle Repertoire der 2PD- K^+ -Kanäle ist sehr groß (Tab. 1.2) und durch zahlreiche physiologische und pharmakologische Regulatoren, darunter auch Inhalationsanästhetika, beeinflussbar (Tab. 1.3) (Patel *et al.*, 1999; Shin *et al.* 2003; Sirois *et al.*, 2000).

Über die Physiologie nativer 2PD-K⁺-Kanäle beim Menschen ist noch immer wenig bekannt. Daten zu ihrer Funktion stammen überwiegend aus Untersuchungen im heterologen Expressionssystem an 2PD-K⁺-Kanälen von Säugern.

Funktionelle Bedeutung von 2PD-K⁺-Kanälen
<ul style="list-style-type: none"> • Chemozeption durch Neurone im <i>Glomus caroticum</i>, im Atemzentrum der <i>Medulla oblongata</i> u.a. • Neuroprotektion über Hyperpolarisation und verminderten Ca⁺⁺-Einstrom im ZNS • Einstellung des Membranpotenzials und damit Einflussnahme auf prinzipiell alle Funktionen erregbarer Membranen • Über Rezeptorkopplung Beteiligung an neurohumeralen Steuerungsprozessen • Einfluss auf Herzkontraktibilität über mechanosensitive Myokardiozyten • Geschmackswahrnehmung (der Qualität 'sauer') an Epithelzellen der Mundschleimhaut • Induktion der Aldosteronsynthese durch K⁺-sensitive Zellen

Tab. 1.2 Physiologische Funktionen von 2PD-K⁺-Kanälen (nach Buckingham *et al.*, 2005).

wichtige physiologische Regulatoren	wichtige pharmakologische Regulatoren
<ul style="list-style-type: none"> • physikalische Reize <ul style="list-style-type: none"> - Temperatur - Membranstress • chemische Reize <ul style="list-style-type: none"> - pH (H⁺) intra- und extrazellulär - pCO₂, pO₂ - Proteinkinase A - Proteinkinase C - Anandamid - Arachidonsäure - bioaktive Lipide (PUFA, LPC) 	<ul style="list-style-type: none"> • Inhalationsanästhetika <ul style="list-style-type: none"> - Halothan - Isofluran - Sevofluran - Chloroform - Diethylether • Lokalanästhetika <ul style="list-style-type: none"> - Lidocain - Bupivacain • Neuroprotektiva <ul style="list-style-type: none"> - Riluzol - Sipatrigin, Lamotrigin • Stimulanzien <ul style="list-style-type: none"> - MDMA (Ecstasy)

Tab. 1.3: Auswahl wichtiger physiologischer und pharmakologischer Regulationsfaktoren von 2PD-K⁺-Kanälen (Kindler *et al.*, 2000; Lesage *et al.*, 2000b; Lesage, 2003).

Abkürzungen: *PUFA* (*polyunsaturated fatty acids*) mehrfach ungesättigte Fettsäuren; *LPC* Lysophosphatidylcholin; *MDMA* 3,4-Methylenedioxyamphetamin).

Einzelheiten zu physiologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften sowie zur Gewebsexpression der in dieser Arbeit untersuchten Kanäle sind im Anhang (s. 7) beschrieben.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Kernpunkt dieser Arbeit ist die interessante pharmakologische Regulation der 2PD-K⁺-Kanäle durch Inhalationsanästhetika. Über die molekularen Grundlagen dieser Interaktion und deren Bedeutung *in vivo* ist noch immer sehr wenig bekannt.

Am Beispiel von Halothan, das in der aktuellen Literatur in diesem Zusammenhang am häufigsten verwendete Inhalationsanästhetikum, soll im Hauptteil der Arbeit mit elektrophysiologischen Methoden die Wirkung der Inhalationsanästhetika auf den Aktivitätszustand der unterschiedlichen Subgruppen der 2PD-K⁺-Kanäle beschrieben werden. Die in *Xenopus*-Oozyten exprimierten 2PD-K⁺-Kanäle dienen hierbei als Modell nativer 2PD-K⁺-Kanäle.

Es wird eine pharmakologische Konzentrations-Wirkungs-Beziehung erstellt, mit der anschließend Rückschlüsse auf die Bedeutung der 2PD-K⁺-Kanäle für die Vermittlung der Narkose gezogen werden können. Es soll auch untersucht werden, ob diese Halothanwirkung durch andere physiologische Regulatoren der 2PD-K⁺-Kanäle beeinflusst wird.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll anhand von Mutagenese bestimmter Kanalabschnitte der molekulare Wirkmechanismus von Halothan genauer charakterisiert werden: Liegt dem beobachteten Phänomen eine Ligandenbindung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip zugrunde oder vermitteln kompliziertere Mechanismen, etwa ein Ionenkanal-Gate oder komplexe intrazelluläre Signalwege, die Wirkung von Halothan auf die 2PD-K⁺-Kanäle?

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Molekularbiologische Methoden, eingesetzte Bakterienstämme, Medien, Lösungen und Puffer

Lösungen für die *Plasmid-Präparation*

Inhalt und Zusammensetzung der Lösungen für die Plasmidpräparation siehe Protokoll *QIAGEN*[®], Plasmid Midi Kit 100 (*Quiagen*, Hilden, Deutschland)

Bakterienstämme und Medien für die *Transformation*

LB-Medium	Caseinhydrolysat	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	H ₂ O	ad 1 l
LB/Amp-Agar-Platten	LB-Medium	1 l
	Agar	15 g
	Ampicillin	100 µg/ml
verwendete Bakterienstämme	E. coli XL2-blue	

Lösungen für die *in vitro-Transkription*

T7-Polymerase-Puffer	Tris-HCl	0,4 mM
	MgCl ₂	60 mM
	Dithiotreit	100 mM
	Spermidin	20 mM
TAE-Puffer für die Agar-Gel-Elektrophorese	Tris pH 8,3	40 mM
	Acetat	40 mM
	EDTA	1 mM
6fach Probenpuffer für die Agar-Gel-Elektrophorese	0,25% Bromophenolblau-Lösung	25 ml
	30% Glycerol	30 ml
	H ₂ O	45 ml

2 Material und Methoden

2.1.2 cDNA-Klone

Name	Vektor	Herkunft
TREK-1 (rat, Splice form A)	pSGEM	C. Derst, Marburg
TREK-2 (human)	pSGEM	C. Derst, Marburg
TASK-1 (rat)	pSGEM	C. Derst, Marburg
TASK-3 (rat)	pSGEM	Physiologisches Institut Würzburg
TRAAK (human)	pSGEM	C. Derst, Marburg
THIK-1 (rat)	pSGEM	Physiologisches Institut Würzburg
5-HT_{2C}-Rezeptor (mouse)	pSGEM	N. Davidson, Pasadena

Die für diese Arbeit benötigten Mutationen im Kanalprotein wurden durchgeführt von Dr. Elke Wischmeyer und Dr. Volker Schmidt (Physiologisches Institut der Universität Würzburg) und Prof. Dr. Regina Preissig-Müller (Institut für normale und pathologische Physiologie der Universität Marburg).

2.1.3 Transformation

Als Klonierungsvektor diente das Plasmid pSGEM. Die Vektorpräparation wurde durchgeführt von Dr. Elke Wischmeyer und Dr. Volker Schmidt (Physiologisches Institut der Universität Würzburg).

Zur Transformation wurden 200 µl kompetenter Bakterien des gewünschten *E.coli*-Stammes mit 100 ng DNA versetzt. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Tubes im Thermoblock 45 s bei 42 °C erwärmt und anschließend 1 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 400 µl LB-Medium wurde das Gemisch für 1 h bei 37 °C in Schräglage im Warmschüttler inkubiert. Der Transformationsansatz wurde dann auf vorgewärmten Agarplatten mit Ampicillin (50 mg/ml in H₂O) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C in den Brutschrank gestellt.

2.1.4 Isolierung der Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA folgte dem Protokoll *QUIAGEN Plasmid Midi* (Quiagen, Hilden, Deutschland). 3ml LB-Medium mit 3µl Ampicillin wurden unter sterilen Bedingungen mit einer Einzelkolonie des Plasmid-tragenden Bakterienstammes angeimpft und ca. 7 h bei 37 °C im Warmschüttler (Edmund Bühler SM-30) inkubiert. 500 µl aus dieser Vorkultur wurden anschließend unter sterilen Bedingungen in 50 ml LB-Medium mit 50 µl Ampicillin geimpft und über Nacht im Warmschüttler bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die

Bakteriensuspension in einem GSA-Becher zentrifugiert (Beckmann J2-MC, 8 min, 8000 rpm, 4° C), und das erhaltene Bakteriensediment entsprechend der Vorgaben des *QIAGEN*[®] Plasmid Midi Kit 100-Protokolls weiterverarbeitet. Das hierbei gewonnene, die DNA enthaltende Sediment, wurde in 200 - 300 µl Wasser (DEPC-behandelt) aufgenommen und gelöst. Zur Bestimmung von Ausbeute und Reinheit der DNA wurde die Extinktion bei 260 nm photometrisch bestimmt (Biometra UNO II).

2.1.5 *In vitro*-Transkription

Das zu transkribierende Fragment wurde in den Polylinker des pSGEM hinter die Promotorregion für die T7-RNA-Polymerase kloniert. 10 µg des isolierten Plasmids wurden in einer 10-fach konzentrierten Pufferlösung (*BioLabs*, New England, USA, entsprechend den Herstellerangaben Pufferlösung 2) mit 30 Einheiten des erforderlichen Restriktionsenzym *Nhe I* (*BioLabs*, New England, USA) in H₂O (bidestilliert) über 3 h bei 37° C linearisiert. Zur Kontrolle des kompletten Verdaus wurde ein Aliquot von 2 µl Linearisationsansatz in 6-fach konzentrierter Pufferlösung und H₂O (bidestilliert) zur Gelelektrophorese eingesetzt (0,8 % iges nicht denaturierendes Agarose-Gel mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung, 80 V, 1 h). Aus dem restlichen Restriktionsansatz wurde nach zweimaliger Chloroform-Phenol-Extraktion die DNA durch Einstellen von 0,1 Volumen NaAc und 2,5 Volumen Ethanol (100 %, -20 °C) über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation in der Kühlzentrifuge (4 °C, 13.000 U/min, Biofuge fresco, *Heraeus*, Hanau), wurde die DNA am nächsten Tag mit 500 µl Ethanol (70 %, -20°C) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (4 °C, 13.000 U/min) und Trocknen in der speed-vac wurde die linearisierte DNA in 25 µl Wasser (DEPC-behandelt) aufgenommen. Mit 2 µl dieser Lösung wurde nun zur Kontrolle eine spektroskopische Konzentrationsbestimmung bei 260 nm durchgeführt.

Die Zusammensetzung des Transkriptionsansatzes wurde für ein Endvolumen von 60 µl berechnet: Zur Synthese der cRNA wurden 2-3 µg der linearisierten Matrize in 17-20 µl Wasser (DEPC-behandelt) aufgenommen. Nach Zugabe von je 5 µl ATP, CTP, UTP und GTP mit 5 µl eines cap-Analogons (m⁷G(5')Gppp(5')G) (*Pharmacia Biotech*, Freiburg, jeweils 10 mM), sowie 6 µl 10 fach-konzentrierten T7-Polymerase-Puffers wurde der Transkriptionsansatz in Gegenwart von 2,5 µl Ribonuklease-Inhibitor (40 U/µl, *Boehringer*, Mannheim) und 2,5 µl T7-RNA-Polymerase (20 U/µl,

2 Material und Methoden

Boehringer, Mannheim) bei 37°C für 1 h inkubiert. Die Synthese der cRNA wurde mit dem Verdau der DNA-Matrize durch Zugabe von 15 µl ribonukleasefreier DNase I (*Roche*, Mannheim, 10U/µl) bei 37 °C nach 15 min beendet. Nach zweimaliger Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die wässrige Lösung mit 0,1 Volumen NaAc und 2,5 µl Ethanol (100%, -20°C) über Nacht bei -20°C gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation wurde das Sediment mit 200 µl Ethanol (70%, 10°C) gewaschen und in der speed-vac getrocknet. Die cRNA wurde abschließend in 10 µl Wasser (DEPC-behandelt) aufgenommen. Ein Aliquot mit 1 µl wurde zur Konzentrationskontrolle in eine Gelelektrophorese eingesetzt. (1,5 %iges nicht-denaturierendes Agarosegel, 1 µl Ethidiumbromid-Lösung, 80 V, 1 h). Durch den Vergleich mit dem RNA-Marker ließ sich die Konzentration der synthetisierten cRNA grob abschätzen. Die Schärfe der Bande diente als Qualitätsmaß der cRNA. Die restliche Lösung wurde bei -80 °C gelagert. Zur Injektion in *Xenopus*-Oozyten wurde auf eine Aufreinigung der RNA verzichtet.

2.2 Elektrophysiologische Methoden

2.2.1 Für elektrophysiologische Messungen verwendete Substanzen und Lösungen

Kalium-Lösung	NaCl	2 mM
	KCl	96 mM
	MgCl ₂ * 6 H ₂ O	1 mM
	CaCl ₂ * 6 H ₂ O	1 mM
	Hepes	5 mM
	mit 1 M NaOH auf pH 7,4 titrieren	
Kollagenase-Lösung	Kollagenase Typ 1	25 mg
	ND 96-Lösung	10 ml
ND96-Lösung	NaCl	96 mM
	KCl	2 mM
	MgCl ₂ * 6H ₂ O	1 mM
	CaCl ₂ * 6H ₂ O	1 mM
	Hepes	5 mM
	mit 1 M NaOH auf pH 7,4 titrieren	
ND96-Lösung (saurer Milieu)	ND-96-Lösung	
		mit 1 M HCl auf pH 6,8 bzw. 4,5 titrieren
ND96-Oozytenaufbewahrungslösung	NaCl	96 mM
	KCl	2 mM
	MgCl ₂ * 6H ₂ O	1 mM
	CaCl ₂ * 6H ₂ O	1 mM
	Hepes	5 mM
	Natriumpyruvat	2 mM
	Gentamycin	100 µg/ml
	mit 1 NaOH auf pH 7,4 titrieren	

Lösungen für pharmakologische Messungen

Halothan ist eine farblose, süßlich riechende Flüssigkeit, die weder brennbar noch explosiv ist. Unter Lichteinwirkung zerfällt Halothan in flüchtige Säuren und Brom. Auch bei Lagerung in lichtgeschütztem Gefäß ist zur chemischen Stabilisierung die Beimischung von 0,01 % Thymol notwendig.

2 Material und Methoden

ND96-Lösung (Raumtemperatur) diene als Lösungsmedium für 5- α -Methyl-Hydroxytryptamin, Arachidonsäure, BAPTA-AM, Halothan und Lysophosphatidylcholin in den im Text angegebenen Konzentrationen (Bezugsquelle der Substanzen für die pharmakologischen Messungen ist jeweils *Sigma-Aldrich*, Steinheim). Die Lösungen wurden unmittelbar vor jeder Versuchsreihe angesetzt und nach spätestens 2 h verworfen. 5- α -Methyl-Hydroxytryptamin, Arachidonsäure, BAPTA-AM und Lysophosphatidylcholin werden als 10 μ M Stammlösung in ND96 angesetzt und bei -20 °C aufbewahrt. Das Halothan wurde im Originalbehältnis bei -20 °C gelagert und lag somit in flüssigem Aggregatzustand vor. Alle Lösungen wurden mit NaOH bzw. HCl auf pH 7,4 nachtitriert.

2.2.2 Vorbereitung der *Xenopus*-Oozyten

Die elektrophysiologischen Untersuchungen dieser Arbeit wurden an Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* durchgeführt. Ausgewählt wurde dieses Expressionssystem aufgrund der niedrigen Dichte endogener Kalium-Kanäle und der einfachen Handhabung der im Durchmesser 1-1,5 mm großen Eizellen. Die Oozyten sind in der G₂-Phase des Zellzyklus arretiert, die elektrophysiologischen Ableitungen wurden also nicht von Veränderungen im Rahmen des Zellzyklus beeinflusst. Die Präparation der Frosch-Oozyten wurde im Anatomischen

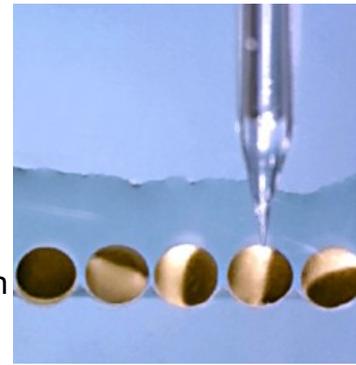


Abb. 2.1: Oozyten von *Xenopus laevis* in Reifephase IV-VI, während Injektion der cRNA.

Institut der Universität Würzburg vorgenommen. Falls erforderlich, werden die Oozyten zunächst für 2-3 h in einer Kollagenase-Lösung inkubiert, um restliche Blutgefäße, Bindegewebe und vor allem das Follikel epithel abzudauen. Nur Oozyten der Reifephase IV-VI eignen sich für die elektrophysiologischen Untersuchungen. Unter einem Binokular (Stereomikroskop SV-11, ZEISS, Oberkochen) ließen sich diese beiden letzten Reifephase aufgrund ihrer Größe und der deutlichen farblichen Abgrenzung der beiden Pole leicht von den unreifen Oozyten abgrenzen (Abb. 2.1). Die Oozyten wurden in ND96-Lösung, versetzt mit Gentamycin (5 mM) und Na⁺-Pyruvat, im Inkubator bei 19 °C aufbewahrt. Bei Bedarf wurde das Medium gewechselt. Die Oozyten wurden auf diese Weise maximal 5 Tage gelagert. 24,4 - 41,7 nl cRNA wurden mit Hilfe eines in drei Ebenen beweglichen Mikromanipulators und eines vollautomatischen Nanoliterinjektors (*WPI*, Sarasota, USA) direkt ins

Zytoplasma der Oozyten injiziert (Abb. 2.1). Die dafür benötigten Injektionspipetten wurden mit Hilfe eines Mikroelektrodenpullers (Micropipette Puller P-97, *Sutter Instrument Company*, Novato, USA) aus dünnwandigen Borosilikatglas-Kapillaren (3.5" Drummond, *Schütt Labortechnik*, Würzburg) gezogen. Die Spitze dieser Injektionskanüle, mit einem Durchmesser von 10-15 μm , wurde unter dem Binokular abgebrochen, was das Einstechen in die Oozyte erleichterte. Die Glaskapillaren wurden vor Befüllung mit der cRNA mit Paraffinöl (zur Abdichtung und Vermeidung von Luftblasen) gefüllt. Die Menge der injizierten cRNA wurde abhängig von Verdünnungsgrad und Expressionsstärke der verschiedenen Transkripte gewählt. Bis zur Expression einer für die elektrophysiologischen Messungen ausreichenden Menge an funktionellem Protein vergehen mehrere Stunden bis Tage. Mit den Messungen wurde daher erst nach 1-3 Tagen begonnen. Dabei wurde jede Oozyte höchstens zweimal für eine Messung verwendet.

2.2.3 Methode der zwei-Elektroden-Spannungsklemme an *Xenopus* Oozyten

Diese von Hodgkin, Huxley und Katz für das Riesenaxon des Tintenfisches entwickelte Methode ermöglicht es, Ströme zu messen, die über die gesamte Membran der Oozyte fließen (Abb. 2.2). Das Membranpotenzial wird dabei konstant auf einem bestimmten Wert gehalten.

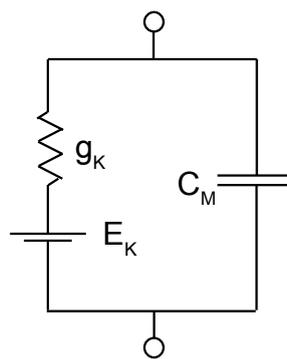


Abb. 2.2: Modell einer K⁺-selektiven Membran (Ersatzschaltbild; Abb. aus Hille, 1992, S.16). Elektrophysiologisch entspricht die Zellmembran einem elektrischen Schaltkreis mit zwei Komponenten: Die Kalium-selektive Pore als leitender Diffusionspfad mit der elektromotorischen Kraft E_K und der Leitfähigkeit g_K und daneben die Lipid-Doppelschicht als kapazitiver Zweig mit der Kapazität C_M .

Zur Messung nach dieser Methode werden zwei Elektroden in die Oozyte eingestochen (Abb. 2.3): Mit der ersten Elektrode und einer in der

2 Material und Methoden

Umgebungslösung befindlichen Badelektrode kann das Membranpotenzial der Oozyte gemessen werden. Mit der zweiten Elektrode wird Strom appliziert, und zwar in genau der Stärke, die notwendig ist, um das Membranpotenzial auf einem vorher festgelegten Wert zu halten bzw. um ein bestimmtes Membranpotenzial zu erreichen. Der beobachtete Strom ist direkter Ausdruck der Ionenbewegungen über die Oozytenmembran, also der Leitfähigkeit dieser Membran, bei bekanntem Membranpotenzial. Mit Hilfe eines Rückkopplungsverstärkers kann der benötigte Strom nachgeregelt und an die Änderungen der Membranleitfähigkeit angepasst werden.

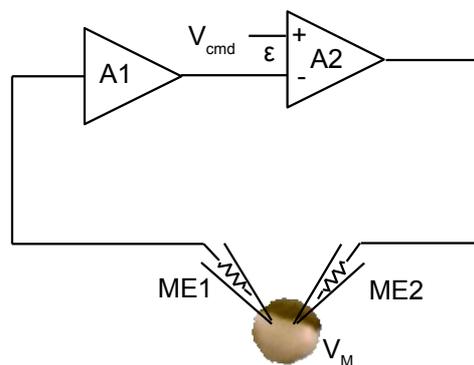


Abb. 2.3: Methode der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (modifiziert nach *The Axon Guide for Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques*, S. 45.).

Das Membranpotenzial (V_M) wird über den Verstärker A1 aufgenommen, der mit der Spannungsmikroelektrode ME1 verbunden ist. V_M wird im Rückkopplungsverstärker A2 mit dem vorgegebenen Haltepotenzial (V_{cmd}) verglichen. Der Output von A2 ist proportional zur Differenz ϵ zwischen V_M und V_{cmd} .

Die Membranleitfähigkeit wird indirekt über die Amplitude des applizierten Stromes bestimmt. Aus Änderungen der Leitfähigkeit der Oozytenmembran können Aussagen über die Leitfähigkeit der Membran und damit über den Aktivitätszustand der dort integrierten Ionenkanäle getroffen werden.

2.2.4 Messaufbau

Für Messungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme benötigt man in der einfachsten Ausstattung ein Mikroskop zur Betrachtung der Zellen, zwei Mikromanipulatoren, mit denen die beiden Elektroden in die Zelle eingebracht werden können, einen Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Verstärker, einen Pulsgenerator, um die Zelle auf die gewünschte Spannung zu klemmen, und schließlich einen Computer, der die gemessenen Strom- und Potenzialwerte digitalisiert und aufzeichnet. Abb. 2.4 zeigt den Messplatz, der für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente verwendet wurde. Er ist auch für Messungen mit der

patch-clamp-Methode geeignet und daher zusätzlich mit einem schwingungsgedämpften Tisch und einem Faraday-Käfig ausgestattet. Der Messplatz ist so gegen mechanische und elektrische Einflüsse aus der Umgebung abgeschirmt. In der Mitte des schwingungsgedämpften Tisches befindet sich das inverse Mikroskop (Axiovert 35, *ZEISS*, Oberkochen, Deutschland). In die Fokusebene des Mikroskopes ist die Messkammer montiert, hergestellt aus nicht-leitendem Plexiglas. In ihrer Mitte ist eine kleine Vertiefung zur stabilen Lagerung der Oozyte eingelassen. Ebenfalls auf dem schwingungsgedämpften Tisch befestigt sind zwei Säulen, an denen die beiden Mikromanipulatoren mit den Elektrodenhaltern angebracht sind. Alle metallischen Teile sind mit einem niederohmigen Kabel geerdet. Als zentraler Erdungspunkt dient eine Kupferplatte innerhalb des Faraday-Käfigs. Mit dem EPC9-gesteuerten Verstärker (*HEKA Elektronik*, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) in dieser Konfiguration können über der Oozytenmembran Ströme im Bereich von 0,5 - 30 μA gemessen werden. Zum Schutz vor elektrischen Störungen ist in diesen Verstärker ein Filter integriert.

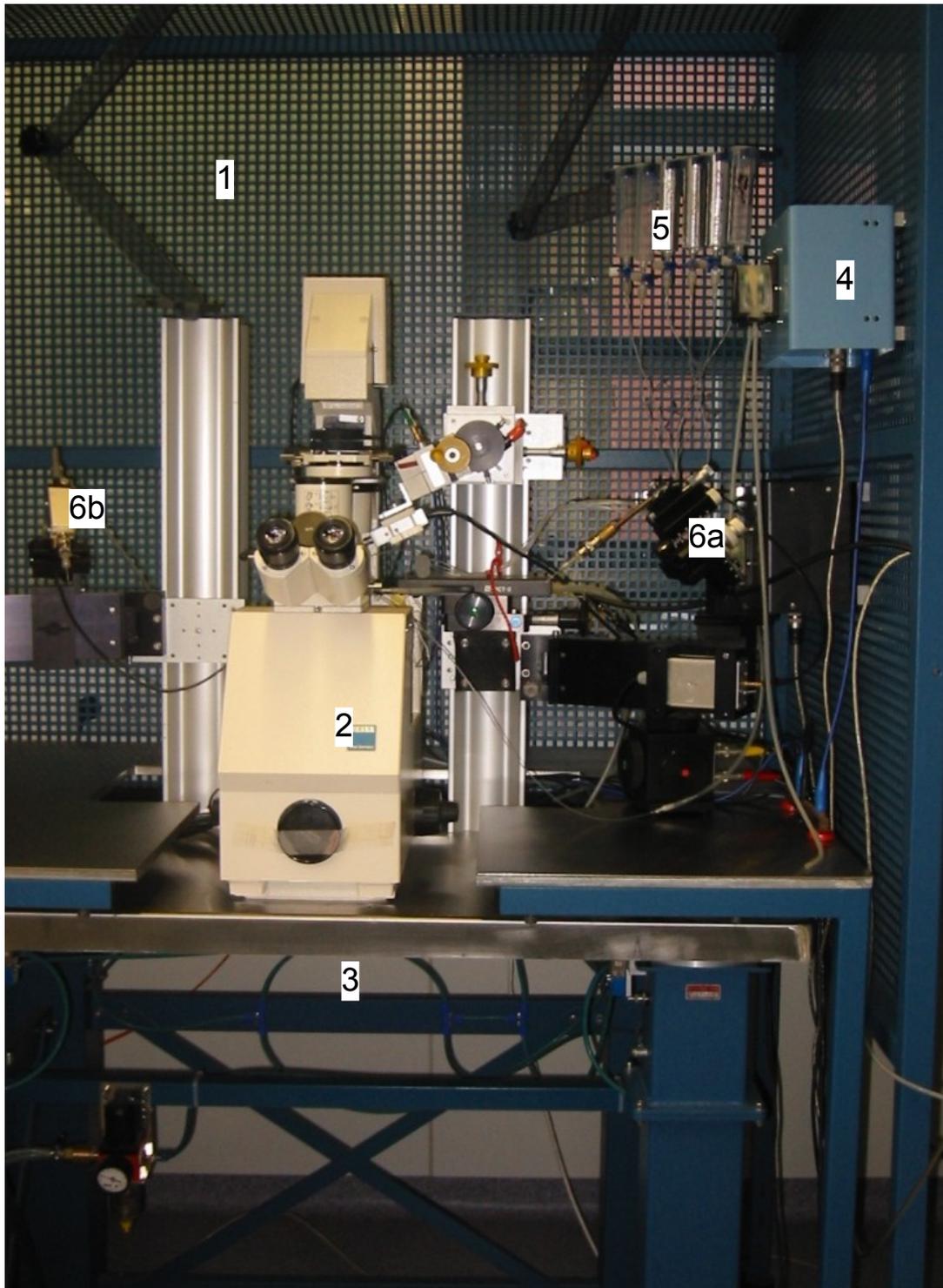


Abb. 2.4: Messplatz am Physiologischen Institut, Lehrstuhl für Neurophysiologie an der Universität Würzburg.

- 1 Faradaykäfig
- 2 Inversmikroskop
- 3 Schwingungsgedämpfter Tisch
- 4 Hydraulische Pumpe für die Badperfusion
- 5 Perfusions-Behälter
- 6a Hydraulischer Mikromanipulator für die intrazelluläre Strom-Elektrode
- 6b Hydraulischer Mikromanipulator für die intrazelluläre Spannungs-Elektrode

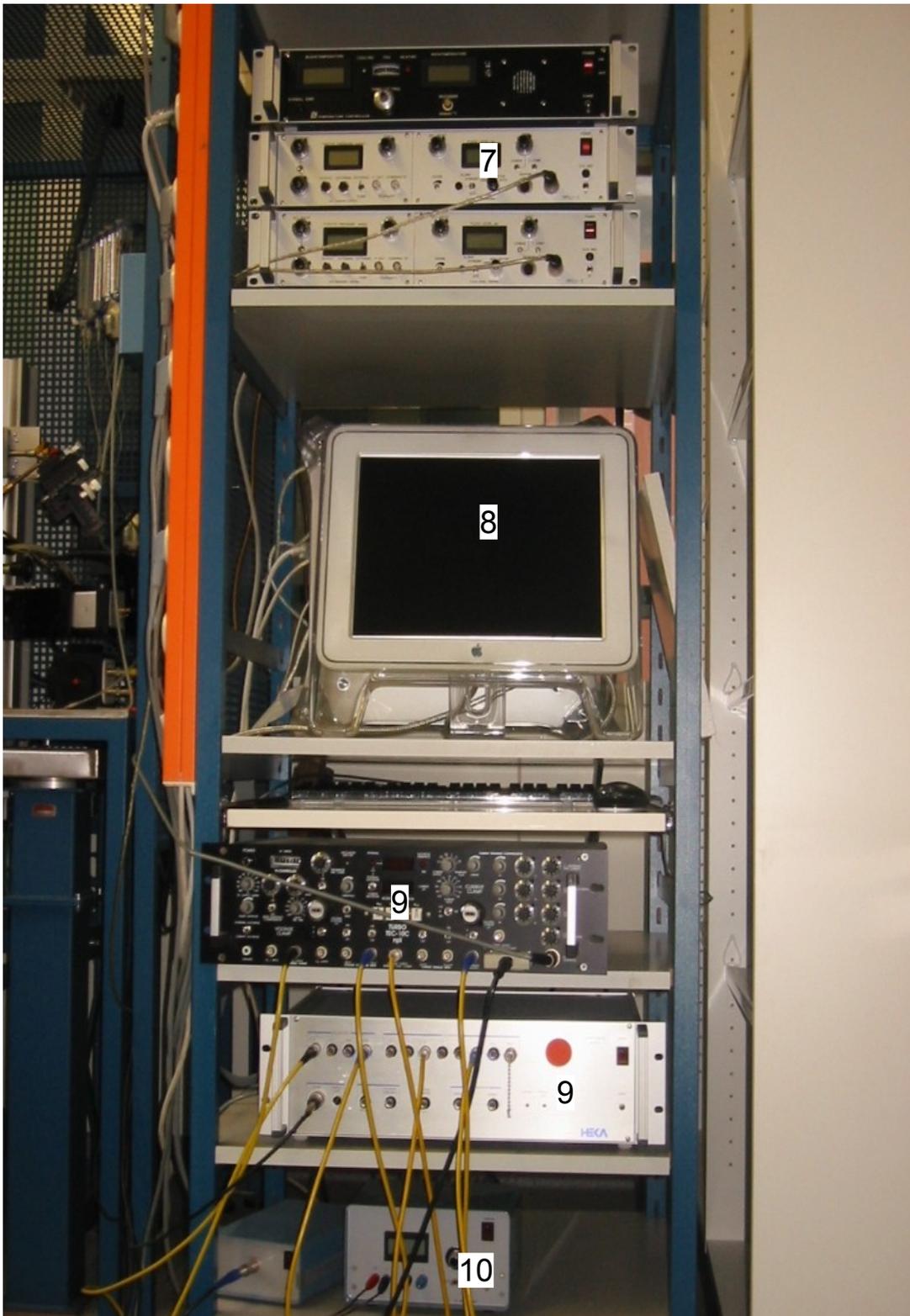


Abb. 2.4: Fortsetzung.

- 7 Steuerung hydraulische Pumpe
- 8 Computer mit Bildschirm
- 9 Zwei-Elektroden-Spannungsklemmenverstärker
- 10 Steuerung Inversmikroskop

2.2.5 Herstellung der Mikroelektroden

Als Strom- bzw. Spannungselektroden fungierten chlorierte Silberelektroden. Die Glaselektroden aus Borosilikat mit Filament (*HARVARD APARATUS*, Kent, UK; GC200F-15) wurden mit einem Puller (L/M-3P-A; *List Medical*, Darmstadt, Deutschland) in zwei Stufen auf einen Spitzendurchmesser von ca. 1 - 3 μm gezogen. Anschließend wurde die Spitze der Glaselektrode unter einem Mikroskop an einem Draht abgebrochen, um später das Einbringen in die Oozyten zu erleichtern. Nach luftblasenfreier Befüllung mit 3 M KCl wurden die Glaselektroden auf dem Elektrodenhalter der Potenzial- und der Stromelektrode befestigt. Der Widerstand der Elektroden sollte nun nicht mehr als 0,5 - 2 M Ω betragen. Die Herstellung der Glaselektroden erfolgte immer erst unmittelbar vor dem Experiment, um eine Verschmutzung zu verhindern. Dank der relativ großen Öffnung an der Elektrodenspitze verstopfen die Elektroden im Laufe der Messungen weniger schnell. Sie konnten daher problemlos für mehrere Experimente verwendet werden.

2.2.6 Messprotokolle

Über das Programm Pulse & Pulse fit (*HEKA*) auf einem Power Macintosh G4 (*Apple Computer*, Cupertino, CA, USA) konnten der Ablauf der elektrophysiologischen Messungen gesteuert und die gewonnenen Daten graphisch dargestellt werden. Es gilt die allgemein verwendete Konvention, den auswärtsgerichteten Strom mit positivem Vorzeichen, den einwärtsgerichteten Strom als negativen Wert darzustellen.

Zu Beginn eines jeden Versuches wurde ein Haltepotenzial von - 60 mV eingestellt. Dieser Wert entspricht in etwa dem Membranpotenzial nativer Oozyten. Zur Ermittlung von Strom-Spannungs-Kurven (IV-Kurven) wurde das Haltepotenzial innerhalb von 2000 ms kontinuierlich von - 150 mV auf + 60 mV depolarisiert. Das Programm trägt in der graphischen Auswertung den geflossenen Strom gegen den jeweiligen Potenzialwert auf (Abb. 2.5). Diese IV-Kurven wurden vor jedem Versuch ermittelt, um die Anwesenheit eines K⁺-Leckstromes zu überprüfen. Gemäß der Nernst-Gleichung verschiebt sich das Umkehrpotenzial bei Zunahme der extrazellulären K⁺-Konzentration in depolarisierender Richtung. Durch Applikation hochkonzentrierter K⁺-Lösung konnte so die Kalium-Selektivität gezeigt werden.

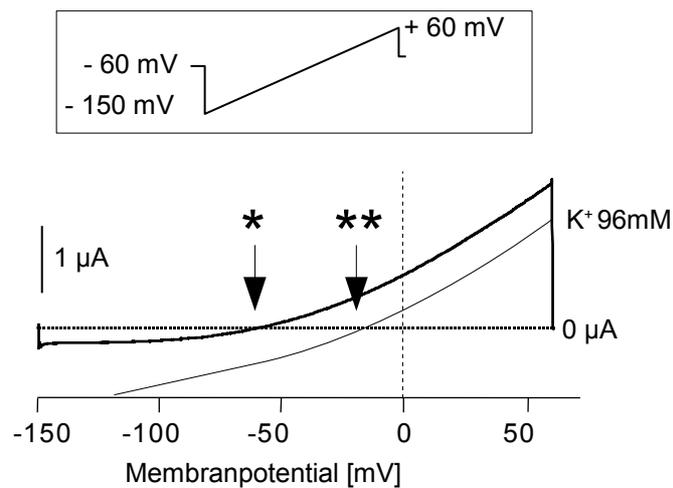


Abb. 2.5: Typische Strom-Spannungskurve eines auswärts gerichteten K^+ -Stromes (gemessen an einer *Xenopus*-Oozyte, die den 2PD- K^+ -Kanal *TASK-1* exprimiert). Die Messung erfolgte nach Applikation des im Einsatzbild dargestellten Spannungspulses, ausgehend vom Haltepotential (-60 mV) von -150 mV bis +60 mV bei unterschiedlichen K^+ -Konzentrationen in der Badlösung. Der Nulldurchgang der Strom-Spannungskurve (Umkehrpotential) befindet sich im Bereich des K^+ -Gleichgewichtspotenzials. Dieses verschiebt sich bei hoher extrazellulärer Kaliumkonzentration in depolarisierender Richtung (* \rightarrow **).

Für die pharmakologischen Messungen wird ein anderes Protokoll verwendet: In Abständen von 3 s wird die Membran ausgehend vom Haltepotential (-60 mV) für die Dauer von 200 ms auf +30 mV depolarisiert und der bei diesem Membranpotential über die Zeit ableitbare Strom aufgezeichnet (Abb. 2.6).

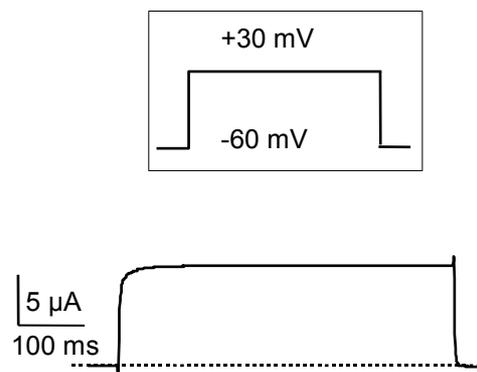


Abb. 2.6: Strom über den 2PD- K^+ -Kanal *TASK-1* nach depolarisierenden Spannungspulsen. Die Einsatzfigur zeigt den in der Spannungsklemme über die Oozyten-Membran alle 3 s applizierte Spannungspuls.

2.2.7 Applikation der Perfusionslösungen

Die Oozyten wurden in der Spannungsklemme unterschiedlichen Lösungen ausgesetzt. Als Vorratsbehälter dienten sechs 35 ml-Spritzen, die höhenverstellbar 20 - 40 cm über dem Messplatz angebracht waren. Mittels Drei-Wege-Hähnen

2 Material und Methoden

konnte der Zulauf einzelner Spritzen unmittelbar gestartet oder unterbrochen werden. Über Polyethylen-Schläuche mit einem inneren Durchmesser von 0,1 mm floss das Perfusat mit einer konstanten Geschwindigkeit von 2 - 4 ml/min (abhängig von der Höhe, in der die Vorratsbehälter angebracht waren) in die Messkammer des Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Messplatzes. Die Zeit für einen Lösungswechsel betrug in diesem System < 3 s. Als Badlösung bzw. zum Ausspülen der verschiedenen Lösungen aus der Messkammer wurde bei jedem Versuch eine dem extrazellulärem Milieu ähnelnde Elektrolytlösung (ND96-Lösung) verwendet. Bei Experimenten mit lichtempfindlichen Substanzen wie Halothan wurden die Spritzen vollständig mit handelsüblicher Aluminium-Folie verschlossen. Nach jedem Versuch wurde das Perfusionssystem mit destilliertem Wasser gereinigt und durchgespült. In der Messkammer war direkt gegenüber dem Zulauf des Perfusionssystems der entsprechende Ansatz einer MPCU-3 Pumpe angebracht. So ließ sich die Flüssigkeitsmenge in der Messkammer konstant halten. Außerdem wurde in der Messkammer eine annähernd laminare Strömung erzielt, was sicherstellte, dass die zulaufenden Lösungen sofort die Oozyte erreichen und ebenso schnell wieder vollständig ausgewaschen werden. Halothan diffundiert sehr schnell durch Zellmembranen. Innerhalb 2 – 10 ns stellt sich ein Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärem Milieu ein (Koubi *et al.*, 2000). Die Oozyte befand sich bei den Messungen mindestens 1 cm vom Perfusionszulauf entfernt, um mechanische Einflüsse durch das Perfusat auf die Zelle so gering wie möglich zu halten.

2.3 Auswertung der Daten

2.3.1 Statistik

Alle Daten werden, wenn nicht anders bezeichnet, als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SA) für n Experimente im Text, in Tabellen sowie in Diagrammen angegeben. Alle im Text verwendeten Formulierungen wie „durchschnittlich“ oder „im Mittel“ beziehen sich auf den arithmetischen Mittelwert. Die Werte wurden bei entsprechender Fragestellung mit dem gepaarten t-Test nach Student auf Signifikanz geprüft, wobei als Signifikanzgrenze $p < 0,05$ angesehen wurde. Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgt mit dem Microsoft-Office xp Programm *Excel*.

Um Unterschiede zwischen einzelnen Oozyten-Entnahmen auszugleichen und die Vielzahl äußerer Einflussfaktoren wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Materialermüdung etc. zu berücksichtigen, wird n für jede einzelne Versuchsreihe möglichst größer 10 gewählt.

2.3.2 Ermittlung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung

Die aus den elektrophysiologischen Messungen gewonnenen arithmetischen Mittelwerte der Kanalaktivierung bzw. -inhibition werden zunächst auf den jeweiligen Maximalwert mit $E_{\max} = 100\%$ (1,0) als gemeinsame Bezugsgröße normiert und anschließend mit Hilfe der Software *IGOR Pro[®] Version 4.0* (*WaveMetrics, Inc., Lake Oswego, OR, USA*) ausgewertet: Die so normierten Ergebnisse werden für alle untersuchten Kanäle in Form einer Tabelle gespeichert und in das Programm *IGOR Pro[®]* geladen. Die Anpassung erfolgt an eine auf der klassischen Rezeptortheorie beruhenden logistischen Funktion (Hill-Gleichung) zur Ermittlung der Effektiv-Konzentration (EC_{50}) und der Steigung n_H (Hill-Koeffizient):

2 Material und Methoden

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

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 Konzentrations-Wirkungs-Kurve ist für jeden Wirkstoff charakteristisch. Vier wichtige pharmakologische Parameter lassen sich aus dieser Funktion ableiten (Urban *et al.*, 2002): Die Potenz des Wirkstoffes, ausgedrückt durch die EC_{50} , die maximale Wirkdosis, bei der die maximale Wirkung erzielt wird, und schließlich Anstiegssteilheit (Hill-Koeffizient) und Kurvenform, die Aussagen über den zugrunde liegenden Wirkmechanismus erlauben.

2.3.3 Berechnung von Abfall- und Anstiegszeitkonstante der Kanalaktivierung bzw. -inhibition

Der Stromanstieg bei Aktivierung der 2PD- K^+ -Kanäle bzw. der Stromabfall bei Inhibition lässt sich anhand einer Exponentialgleichung mathematisch beschreiben und mittels einer Zeitkonstanten quantifizieren. Dazu werden geeignete Originalableitungen aus der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme in dem Programm *Igor Pro*[®] geladen und als Strom-Zeit-Diagramm aufgetragen. Mittels exponentiellem Fitting können Stromanstieg (Aktivierung) bzw. -abfall (Inhibition) durch folgende Formel mathematisch beschrieben werden:

$$I(t) = I_s + I_0 \exp(-\tau_0 \cdot t)$$

$I(t)$	Strom zum Zeitpunkt t
I_s	Steady-State-Strom
I_0	Komponente des Stromabfalls bzw. -anstiegs
τ_0	Zeitkonstante der Aktivierung bzw. Inhibition

2.3.4 Graphische Darstellung

Die graphische Darstellung der gezeigten Balkendiagramme erfolgte mit dem Microsoft-Office xp Programm *Excel*. Die Original-Ableitungen aus *Pulse & Pulse fit* (*HEKA Elektronik*, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) werden in *IGOR Pro*[®] Version 4.0

(*WaveMetrics, Inc.*, Lake Oswego, OR, USA) exportiert und dort graphisch bearbeitet. Auch die Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven erfolgt mit Hilfe des Programmes *IGOR Pro*[®] *Version 4.0*.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von Halothan auf die einzelnen Subfamilien der 2PD-K⁺-Kanäle

Halothan beeinflusst den Aktivitätszustand der 2PD-K⁺-Kanäle *TASK-1*, *TASK-3*, *TREK-1*, *TREK-2*, *TRAAK* und *THIK-1*. Die Oozyten werden in der Spannungsklemme Halothan in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt und die Veränderungen der K⁺-Leckleitfähigkeit aufgezeichnet (Abb. 3.1A und B).

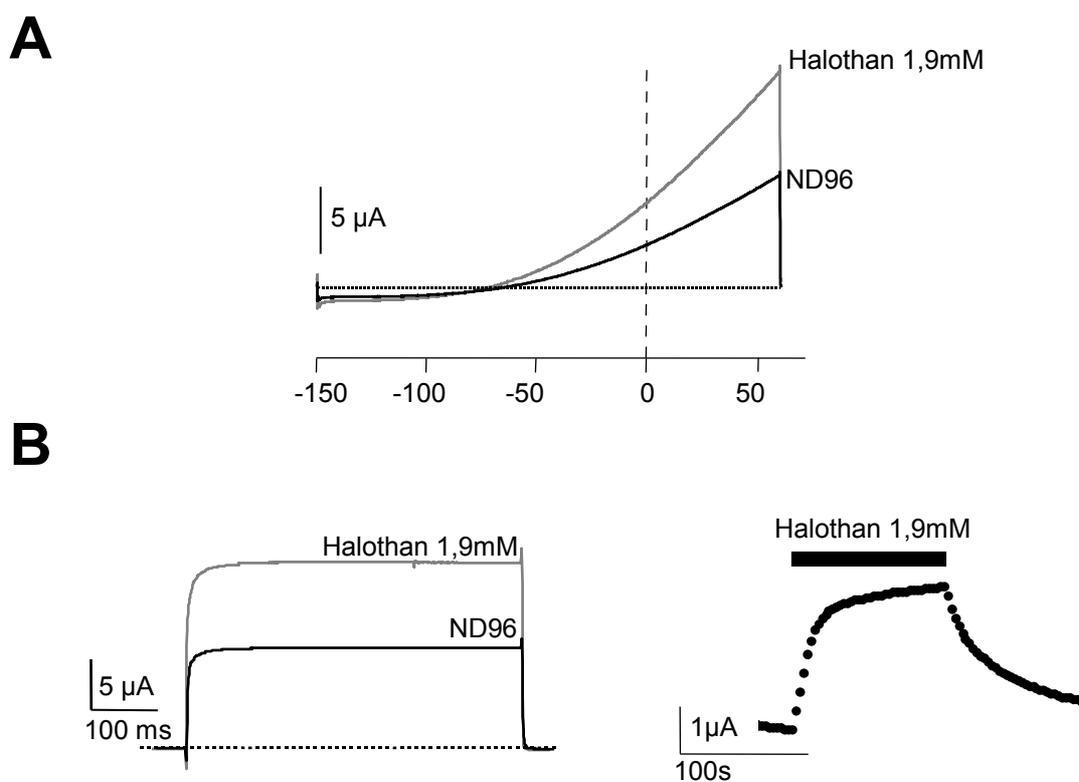


Abb. 3.1 Halothan-vermittelte Veränderung der K⁺-Leckleitfähigkeit über der Oozytenmembran am Beispiel von *TASK-1*-exprimierenden Oozyten.

(A) Die Strom-Spannungskurve folgt dem für einen auswärts gerichteten K⁺-Strom typischen Verlauf. Halothan bewirkt ein Öffnen der *TASK-1*-Kanäle, der K⁺-Ausstrom nimmt zu. In der IV-Kurve zeigt sich dies durch einen zunehmenden auswärtsgerichteten, positiven Strom (graue Linie). (B) Die Aktivierung von *TASK-1* durch Halothan lässt sich auch über Applikation depolarisierender Spannungspulse darstellen. Die Amplitude der bei diesem depolarisierten Membranpotenzial gemessenen Stromes nimmt bei Aktivierung der Kanäle zu (graue Linie). Die Auftragung der bei jedem Spannungssprung bestimmten Stromamplitude im Zeitverlauf ergibt das rechts dargestellte Strom-Zeit-Diagramm.

THIK-1 wird durch Halothan inhibiert, *TASK-1*, *TASK-3*, *TREK-1*, *TREK-2* und *TRAAK* werden aktiviert. Dabei zeigen sich deutliche Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Zeitverlauf der Aktivierung bzw. Inhibierung (Abb. 3.2 und 3.3).

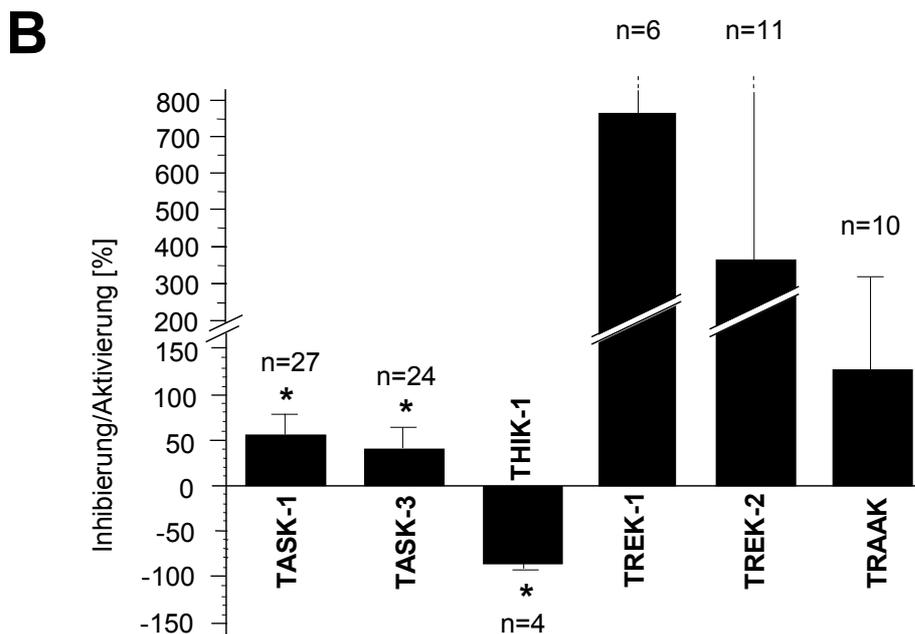
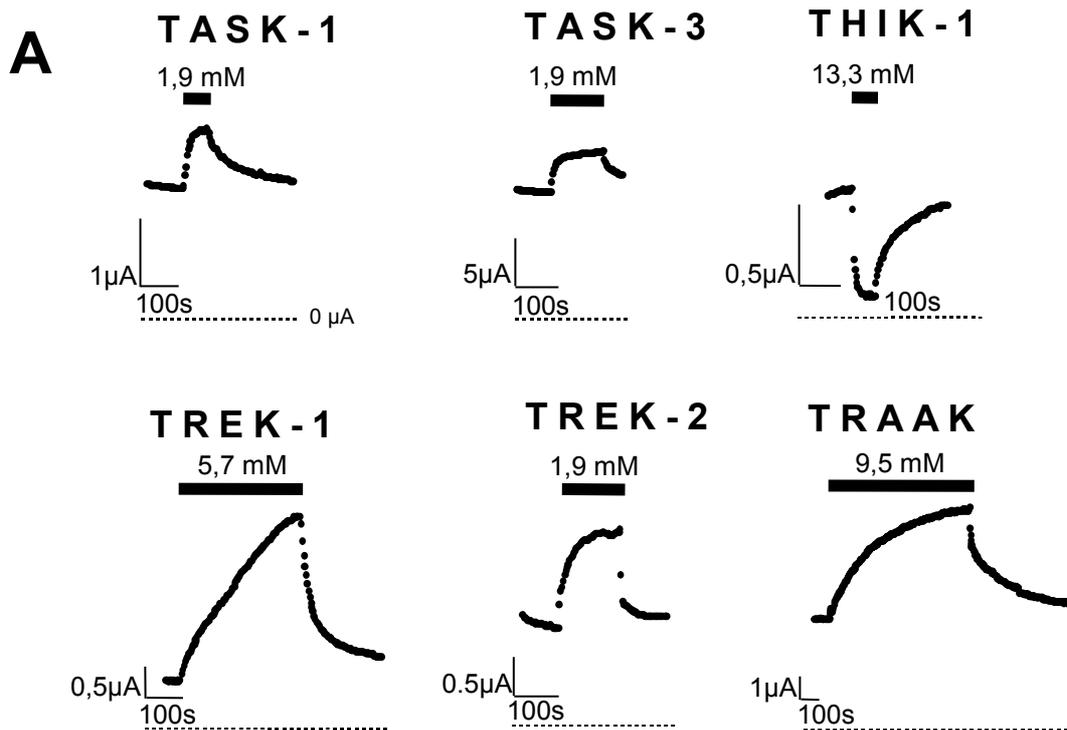
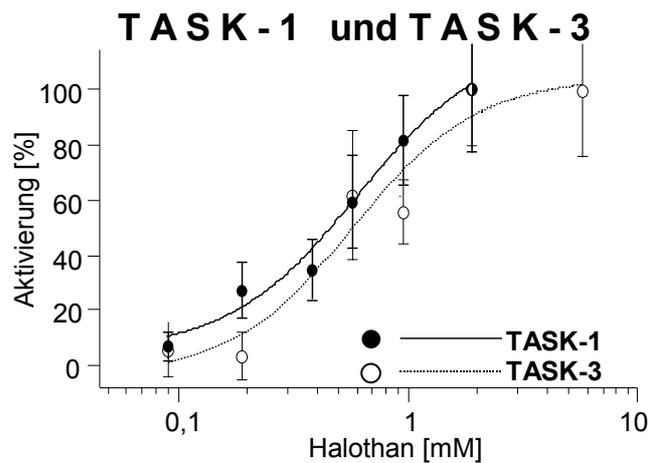
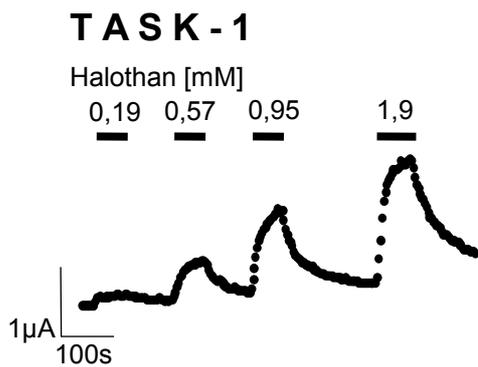


Abb. 3.2: Sensitivität verschiedener 2PD-K⁺-Kanäle gegenüber Halothan.

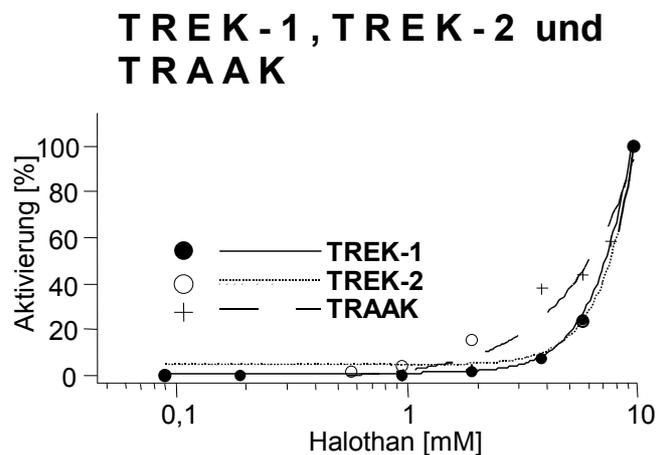
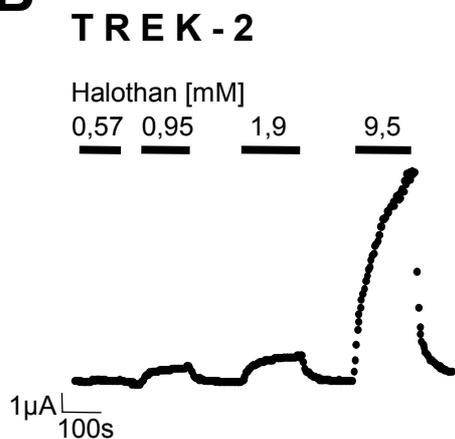
(A) zeigt Originaldaten der Ströme aus der Spannungsklemme, abgeleitet an Oozyten, die die jeweils angegebenen 2PD-K⁺-Kanäle exprimieren. Der gemessene Auswärtsstrom wird durch Halothan in den angegebenen Konzentrationen mit jeweils typischem Zeitverlauf reversibel verstärkt (*TASK-1*, *TASK-3*, *TREK-1*, *TREK-2*, *TRAAK*) bzw. abgeschwächt (*THIK-1*). Das Balkendiagramm (B) stellt die maximale Aktivierung bzw. Inhibition der einzelnen 2PD-K⁺-Kanäle durch Halothan als gemittelte Absolutwerte gegenüber: Der maximale Wert wurde dabei erzielt bei einer Halothankonzentrationen von 1,9 mM (*TASK-1*, *TASK-3*), 13,3 mM (*THIK-1*, *TRAAK*) bzw. 9,5 mM (*TREK-1*, *TREK-2*).

* bezeichnet ein Signifikanzniveau $p < 0,05$. Für *TREK/TRAAK* war bei fehlender Normalverteilung eine Signifikanzprüfung mittels t-Test nicht möglich.

A



B



C

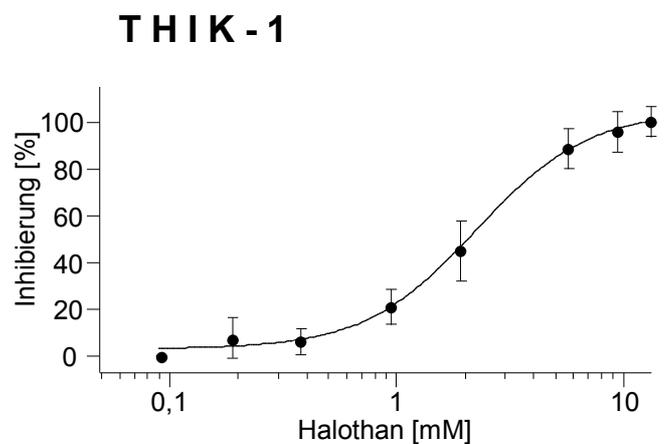
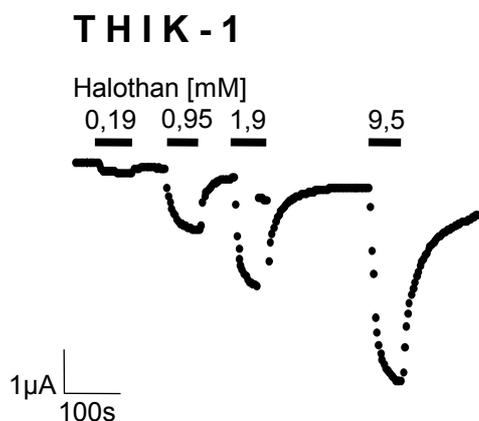


Abb. 3.3: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Halothan und den 2PD-K⁺-Kanälen TASK-1, TASK-3 (A), TREK-1, TREK-2, TRAAK (B) und THIK-1 (C).

Das Inhalationsanästhetikum Halothan aktiviert (A), (B) bzw. inhibiert (C) 2PD-K⁺-Kanäle konzentrationsabhängig. Die Abbildungen auf der linken Seite zeigen jeweils die Rohdaten aus der

Konfiguration der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme. Auf der rechten Seite findet sich für jeden Kanal die anhand solcher Messungen ermittelte Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Die Amplitude des bei verschiedenen Halothankonzentrationen gemessenen Auswärtsstromes wurde normiert auf den jeweiligen Maximalwert der Halothanaktivierung bzw. -inhibition. Die Mittelwerte der normierten Daten (\pm Standardabweichung) werden als Funktion der logarithmisch aufgetragenen Halothankonzentration dargestellt. Die hier verwendeten Werte wurden bei jeder der angegebenen Konzentrationen für $n \geq 3$ ermittelt.

TASK-1

1-3 Tage nach Injektion der *TASK-1*-cRNA in die *Xenopus*-Oozyten wird in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme nach depolarisierendem Spannungspuls ein Basis-Auswärtsstrom von $5,5 \mu\text{A} \pm 3,7$ ($n=52$) gemessen. Dieser *TASK-1*-Strom kann durch Halothankonzentrationen $> 0,09$ mM aktiviert werden. Wie Abb. 3.2 A zeigt, erfolgt diese Aktivierung dosisabhängig. Unter Perfusion einer 1,9 mM Halothan-Lösung steigt der Auswärtsstrom unmittelbar um durchschnittlich $52,8 \% \pm 23,3$ an ($n=27$, $p < 0,01$). Dieser Wert kann auch mit höheren Halothankonzentrationen nicht weiter gesteigert werden. Der aktivierte Strom erreicht unter konstanter Perfusion mit Halothan nach ca. 30 s einen Plateau-Wert, der mit Ende der Halothan-Perfusion und beginnender Spülung mit ND96 sofort wieder auf den Basiswert absinkt (Abb. 3.2 A und 3.3 A).

Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Aktivierung von *TASK-1* durch Halothan ergibt eine EC_{50} von $0,45 \text{ mM} \pm 0,22$. Mit der Hill-Gleichung erhält man hierfür einen Hill-Koeffizienten von $1,31 \pm 0,44$ (Abb. 3.3 A).

TASK-3

Die elektrophysiologischen Messungen an *TASK-3* wurden 4 h bis maximal 48 h nach Injektion der cRNA durchgeführt. Bereits nach dieser kurzen Zeitspanne wird über der Oozyten-Membran ein Auswärtsstrom von $18,4 \mu\text{A} \pm 8$ ($n=38$) gemessen.

Das Balkendiagramm in Abb. 3.2 B zeigt für *TASK-3* eine maximale Aktivierung um $42,1 \% \pm 22,1$ ($n=24$, $p < 0,01$) durch 1,9 mM Halothan. Die Aktivierung erfolgt unmittelbar mit Beginn der Halothan-Perfusion und ist reversibel (Abb. 3.2 A).

Das Konzentrations-Wirkungs-Profil in Abb. 3.3A zeigt, dass *TASK-3* durch Halothan in Konzentrationen $> 0,19$ mM aktiviert wird. Oberhalb einer Halothankonzentration von 1,9 mM kann diese Aktivierung praktisch nicht weiter gesteigert werden.

3 Ergebnisse

Unter Verwendung der an 38 Oozyten gemessenen Werte erhält man für *TASK-3* eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mit einer EC_{50} von $0,6 \text{ mM} \pm 0,2$ und einem Hill-Koeffizienten von $1,74 \pm 1$.

TREK-1, TREK-2

Die Grundaktivität der beiden Kanäle *TREK-1* und *TREK-2* ist, verglichen mit den anderen 2PD- K^+ -Kanälen, sehr niedrig. 2-3 Tage nach Injektion der cRNA können an der Oozytenmembran nach depolarisierendem Spannungspuls $1,48 \text{ } \mu\text{A} \pm 0,81$ (n=20) abgeleitet werden. Der mittlere Auswärtsstrom bei *TREK-2*-exprimierenden Oozyten beträgt $1,83 \text{ } \mu\text{A} \pm 1,11$ (n=16).

Beide Kanäle werden durch Halothan aktiviert. Wie die Originaldaten in Abb. 3.2 A und 3.3 B eindrücklich zeigen, führt Halothan in Konzentrationen $> 1,9 \text{ mM}$, ausgehend von der niedrigen Grundaktivität dieser beiden Kanäle, zu einer dramatischen Zunahme des K^+ -Auswärtsstromes. Die Aktivierung beginnt unmittelbar mit der Halothan-Perfusion, der Auswärtsstrom erreicht einen stabilen Plateau-Wert allerdings häufig erst nach mehreren Minuten. Bei ca. 50 % der Messungen kann ein solcher Plateau-Wert jedoch gar nicht dargestellt werden, weil der Strom den messbaren Bereich verlässt oder die Oozytenmembran durch die lang einwirkende hochkonzentrierte Halothan-Perfusion zerstört wird.

Anders bei Halothankonzentrationen $\leq 1,9 \text{ mM}$. Hier fällt die Aktivierung deutlich schwächer aus (für alle Konzentrationen $p < 0,05$). Ähnlich wie bei den *TASK*-Kanälen wird bereits nach Sekunden ein Plateau-Wert erreicht. Die Originaldaten in Abb. 3.3 B veranschaulichen die konzentrationsabhängig unterschiedliche Halothanwirkung am Beispiel von *TREK-2*.

Der für $9,5 \text{ mM}$ Halothan bestimmte Mittelwert der Aktivierung beträgt für *TREK-1* $759,4 \%$ (n=6) und für *TREK-2* 360% (n=11) (Abb. 3.2 B). Eine Sättigung dieser Aktivierung kann auch unter steigenden Halothankonzentrationen nicht dargestellt werden. Zwischen $1,9 \text{ mM}$ und $9,5 \text{ mM}$ schwanken die gemessenen Absolutwerte der Kanalaktivierung zunehmend dosisunabhängig zwischen ca. 30% und 2500% (*TREK-1*) bzw. 1500% (*TREK-2*). Bei einigen Messungen wiederum haben selbst hohe Konzentrationen Halothan keinen Effekt auf den *TREK*-Grundstrom.

Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für die beiden *TREK*-Kanäle ist nicht durch eine Hill-Funktion darstellbar (Abb. 3.3 B). Auch in der Literatur wird eine fehlende

Sättigung der *TREK*-Aktivierung durch Inhalationsanästhetika beschrieben (Gruss *et al.*, 2004). Die in Abb. 3.3 B für *TREK-1* und *TREK-2* angegebene Konzentrations-Wirkungs-Beziehung veranschaulicht die deutlichen quantitativen und qualitativen Unterschiede im Wirkprofil gegenüber den anderen 2PD-K⁺-Kanälen.

TRAAK

Die elektrophysiologischen Untersuchungen an *TRAAK*, dem dritten Mitglied aus der Gruppe der *TREK*-Kanäle, finden 1-2 Tage nach Injektion der cRNA statt. Der *TRAAK*-Grundstrom beträgt bei diesen Messungen $4,0 \mu\text{A} \pm 3,1$ (n=27).

TRAAK galt bisher als nicht sensitiv gegenüber Inhalationsanästhetika wie Halothan (Franks N.P. *et al.*, 2004). Abb. 3.2 A zeigt jedoch eine deutliche, reversible Aktivierung des Kanals durch 9,5 mM Halothan.

Halothan > 3,8 mM aktiviert diesen 2PD-K⁺-Kanal unmittelbar und reversibel, wobei die Stromstärke in Einzelfällen auf bis das 5-fache des Ausgangswertes steigt. Die Originaldaten in Abb. 3.2 A zeigen, dass auch bei *TRAAK* mehrere Minuten vergehen, bis der aktivierte Auswärtsstrom seinen Plateau-Wert erreicht. Die mittlere Aktivierung unter 13,3 mM beträgt dabei im Mittel 129 % (n=10, p < 0,05) (Abb. 3.2 B). Auch hier zeigen die gemessenen Aktivierungen unter hohen Halothankonzentrationen eine große Streubreite zwischen 60,2 % und 386,9 %. Eine Sättigung dieser Halothan-Aktivierung wird mit den verwendeten Halothankonzentrationen nicht erreicht.

Bei fehlendem sigmoidem Verlauf der gezeigten Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ist weder eine Bestimmung der EC₅₀ noch des Hill-Koeffizienten möglich. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung für *TRAAK* lässt sich, wie auch bei den *TREK*-Kanälen, nicht durch eine Hill-Funktion darstellen (Abb. 3.3 B).

THIK-1

1-2 Tage nach Injektion der cRNA in die *Xenopus*-Oozyten kann ein Auswärtsstrom von $2,9 \mu\text{A} \pm 2,4$ (n=16) gemessen werden. *THIK-1* ist unter den bekannten 2PD-K⁺-Kanälen der einzige im ZNS nachgewiesene Subtyp der 2PD-K⁺-Kanäle, der durch Inhalationsanästhetika wie Halothan inhibiert wird.

Die Originaldaten aus Abb. 3.2 A zeigen mit Beginn der Halothanperfusion in einer Konzentration von 1,9 mM eine unmittelbare, reversible Inaktivierung des *THIK-1*-

3 Ergebnisse

Stromes. Eine signifikante Inhibition ($p < 0,05$) wird unter Halothan $> 0,38$ mM beobachtet. Steigert man, wie in Abb. 3.3 C gezeigt, die Halothandosis auf $13,3$ mM, so wird der Auswärtsstrom nahezu vollständig blockiert ($-83,2 \% \pm 6,8$; $n=4$, $p < 0,01$).

Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für diesen Kanal folgt dem in Abb. 3.3 C gezeigten sigmoiden Verlauf. Aus dieser Beziehung ergibt sich ein EC_{50} von $2,29$ mM $\pm 0,18$ und ein Hill-Koeffizient von $1,76 \pm 0,22$.

3.2 Charakterisierung einer Bindungsstelle für Halothan

3.2.1 Identifikation eines 6-Aminosäuren-Motivs am Kanal *TASK-1* mit kritischer Bedeutung für die Halothan-vermittelte Aktivierung

Vergleicht man die Primärsequenz verschiedener 2PD-K⁺-Kanäle, so fällt am Beginn des C-terminalen Endes eine Sequenz von 6 Aminosäuren an Position 243-248 auf, in der sich *TASK-1* und *TASK-3* stark ähneln. Bei den übrigen 2PD-K⁺-Kanälen finden sich in diesem Bereich keine vergleichbaren Motive (Abb. 3.4).

TASK-1	...	I	G	A	F	L	N	L	V	V	L	R	F	M	T	M	...
TASK-3	...	I	G	A	F	L	N	L	V	V	L	R	F	L	T	M	...
TASK-2	...	L	S	L	F	V	N	W	K	V	S	M	F	V	E	V	...
THIK-1	...	C	I	Y	S	L	F	N	V	I	S	I	L	I	K	Q	...
TREK-1	...	F	A	A	V	L	S	M	I	G	D	W	L	R	V	I	...

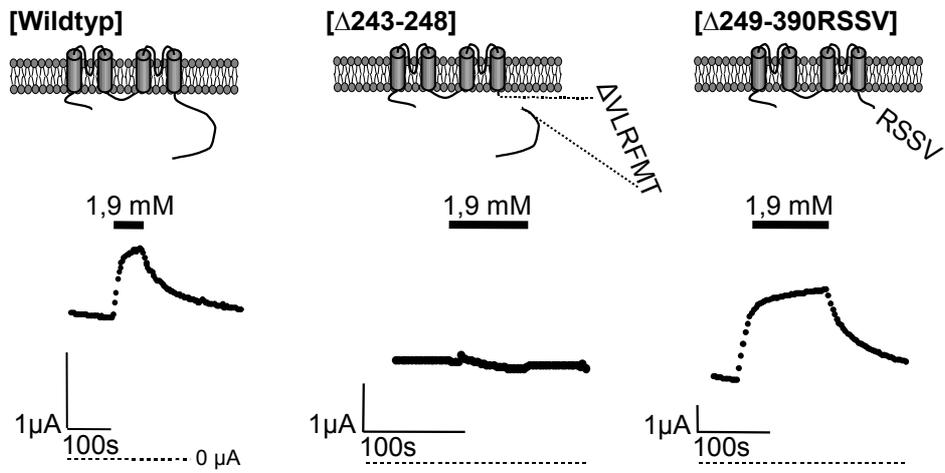
Abb. 3.4: Sequenzvergleich zwischen verschiedenen 2PD-K⁺-Kanälen am Übergang TM4 und C-Terminus.

Die transmembranär gelegenen Kanalabschnitte sind hellgrau unterlegt. Die übereinstimmenden Aminosäurepositionen sind dunkelgrau hervorgehoben.

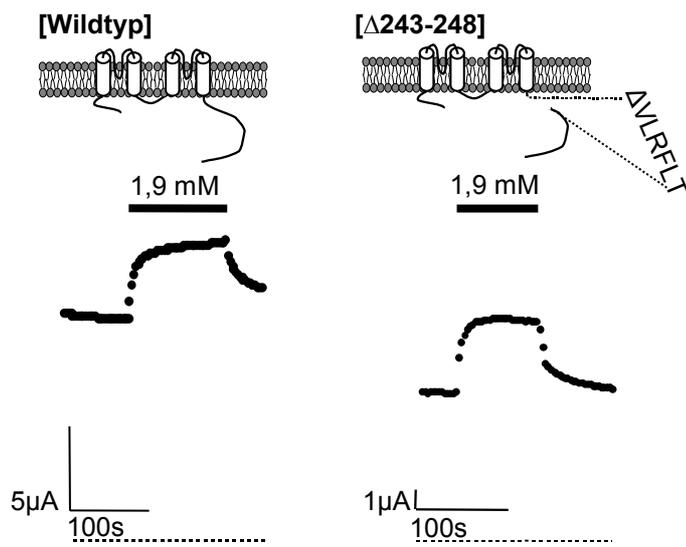
TM4 Transmembrandomäne 4

A

TASK-1



TASK-3



B

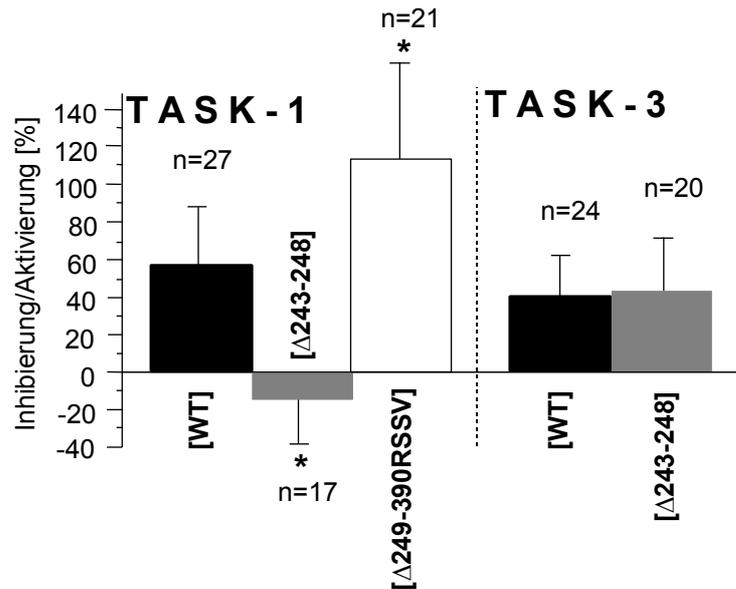


Abb. 3.5: Auswirkung C-terminaler Mutationen auf die Halothansensitivität von TASK-1 und TASK-3.

(A) zeigt Ströme von Oozyten aus der Konfiguration der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme von TASK-1 und TASK-3 und ihren Deletionsmutanten (schematisch dargestellt). Der K^+ -Strom über der Membran von Oozyten, die TASK-1, [Δ243-248] exprimieren, zeigt bei Perfusion von 1,9 mM Halothan keine signifikante Aktivierung. Bei Expression von TASK-1, [Δ249-390RSSV] wird der über die Oozytenmembran gemessene Strom durch 1,9 mM Halothan deutlich aktiviert. Messungen an Oozyten mit Expression der entsprechenden Deletionsmutante des Kanals TASK-3 (TASK-3, [Δ243-248]) zeigen dagegen nach wie vor eine Aktivierung durch 1,9 mM Halothan.

Das Balkendiagramm (B) stellt die gemittelten Absolutwerte des Effektes von 1,9 mM Halothan auf die Wildtypen von TASK-1 und TASK-3 sowie auf die entsprechenden Deletionsmutanten dieser Kanäle gegenüber. Während bei TASK-1 die Mutationen zu einer signifikanten Zunahme (TASK-1, [Δ249-390RSSV]) bzw. Abnahme (TASK-1, [Δ243-248]) der Halothan-vermittelten Aktivierung führen, unterscheidet sich das Verhalten von TASK-3 WT nicht signifikant von seiner Deletionsmutanten.

* bezeichnet ein Signifikanzniveau $p < 0,05$.

TASK-1, [Δ243-248]

Um die Bedeutung dieses Aminosäureabschnittes für den Kanal TASK-1 zu zeigen, wurden die 6 Aminosäuren Valin (V), Leucin (L), Arginin (R), Phenylalanin (F), Methionin (M) und Tyrosin (T) an Position 243-248 aus dem TASK-1-Protein entfernt.

Die Deletionsmutante TASK-1, [Δ243-248] kann in den *Xenopus*-Oozyten erfolgreich zur Expression gebracht werden und ist trotz der Deletion im Bereich des C-Terminus funktionsfähig geblieben. 1-2 Tage nach Injektion der cRNA beträgt die nach depolarisierendem Spannungspuls gemessene Grundaktivität $2,2 \mu A \pm 1,4$ (n=26).

Nach Absenkung des pH-Wertes der ND96-Badlösung von 7,4 auf 4,5 wird der gemessene Basisstrom reversibel inhibiert (keine Abb.), eine für die TASK-Kanäle

3 Ergebnisse

typische Eigenschaft, die sich gut als Hilfsmittel zur Identifizierung eines *TASK*-Stromes eignet.

Halothan führt bei *TASK-1*, [Δ 243-248] auch nach Perfusion > 1 min zu keiner Aktivierung (Abb. 3.5 A). Das Diagramm in Abb. 3.5 B zeigt, dass unter 1,9 mM Halothan eine signifikante Inhibition des K⁺-Leckstromes um 14,4 % \pm 7,9 (n=17, p < 0,01) zu beobachten ist, während der Wildtyp durch die selbe Konzentration Halothan um rund 50% aktiviert wird (s.o.).

***TASK-1*, [Δ 249-390RSSV]**

Bei dieser Deletionsmutante von *TASK-1* wurden die letzten 163 Aminosäuren des C-Terminus entfernt, wobei aber das VLRFMT-Motiv an Position 243-248 als C-terminales Ende belassen wurde. Voraussetzung für einen Transport des Kanalproteins in die Zellmembran ist die Interaktion der letzten 4 Aminosäuren RSSV an Position 386-390 mit dem intrazellulären Protein 14-4-4 (Rajan *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wurden an das Motiv VLRFMT noch die 4 Aminosäuren RSSV angefügt.

1-2 Tage nach Injektion der cRNA zeigt sich in elektrophysiologischen Messungen die erfolgreiche Expression der Mutante *TASK-1*, [Δ 249-390RSSV] bei einem Auswärtsstrom von 6,4 μ A \pm 4,9 (n=26).

Die Originaldaten in Abb. 3.5 A zeigen eindeutig, dass *TASK-1*, [Δ 249-390RSSV] halothansensibel geblieben ist. Halothan bewirkt bei dieser Mutante eine signifikant stärkere Aktivierung (p < 0,01) als beim Wildtypen (*TASK-1*, [Δ 249-390RSSV]: 112,8 % \pm 59,7 für 1,9 mM Halothan; n=21, p < 0,05) (Abb. 3.5 B). Wie der Wildtyp wird die Mutante durch Konzentrationen > 0,09 mM aktiviert (p < 0,05), eine Sättigung dieses Effektes erfolgt bei einer Konzentration von 1,9 mM.

***TASK-3*, [Δ 243-248]**

Wie der Sequenzvergleich in Abb. 3.4 zeigt, besitzt der Kanal *TASK-3* am Beginn des intrazellulären C-Terminus zwischen den Aminosäuren 243-248 das Motiv VLRFLT, das sich von *TASK-1* nur an Position 247 (Leucin) unterscheidet. Auch bei *TASK-3* wurden nun diese 6 Aminosäuren aus dem Protein entfernt. Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten 24 h nach Injektion von 27,6 nl der cRNA. Nach diesem Zeitintervall kann an der Oozytenmembran ein Auswärtsstrom von 4,3 μ A \pm 2,9 (n=23) gemessen werden.

TASK-3, [Δ243-248] ist nach wie vor sensitiv gegenüber Halothan (Abb. 3.5 A). Eine signifikante Aktivierung ($p < 0,05$) von *TASK-3, [Δ243-248]* durch Halothan erfolgt bei einer Halothankonzentrationen $> 0,6$ mM. Bei $n=20$ Messungen erhält man für 1,9 mM Halothan eine durchschnittliche Aktivitätssteigerung um $56,6 \% \pm 28,5$ ($n=20, p < 0,01$) (Abb. 3.5 B). Der Unterschied zu den entsprechenden Werten beim Wildtyp von *TASK-3* ist dabei nicht signifikant ($p > 0,1$). Steigert man die Konzentration der Halothan-Lösung auf 13,3 mM, erzielt man bei *TASK-3, [Δ243-238]* eine mittlere Aktivitätssteigerung um $68,3\% \pm 16,8$ ($n=5, p < 0,05$). Die Aktivierungswerte für die höheren Halothankonzentrationen (Halothan 13,3 mM bzw. 19 mM) sind jedoch signifikant höher ($p < 0,01$), als bei *TASK-3, Wildtyp*. Für die Berechnung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung wird dieser Wert als Maximalwert verwendet. Es ergibt sich so eine EC_{50} von $1,06 \text{ mM} \pm 0,11$ und ein Hill-Koeffizient von $3,0 \pm 0,8$ (keine Abb.).

TASK-3, [L247M]

Indem man bei *TASK-3, [Wildtyp]* die Aminosäure Leucin (L) an Position 247 durch Methionin (M) ersetzt, gleicht man *TASK-3* im Sequenzabschnitt 243-247 an *TASK-1* an.

TASK-3, [L247M] wird durch 1,9 mM Halothan um im Mittel $51,4 \% \pm 34,9$ aktiviert ($n=10, p < 0,01$). Die Aktivierung steigt konzentrationsabhängig bis zu einem Wert von $74,9 \% \pm 37,1$ ($n=4$) bei 9,5 mM Halothan. Aus der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ergibt sich eine EC_{50} von $1,57 \text{ mM} \pm 0,26$ bei einem Hill-Koeffizienten von $2,19 \pm 0,75$ (keine Abb.). Die Effektivkonzentration für die halbmaximale Aktivierung hat sich damit im Vergleich zu den beiden Wildtypen *TASK-1* und *TASK-3* mehr als verdoppelt. Die Mutante ist in ihrer Sensitivität gegenüber Halothan vermindert.

3.2.2 Untersuchung der Rolle einer hydrophoben Bindungstasche bei der Aktivierung des Kanals *TREK-1* durch Halothan

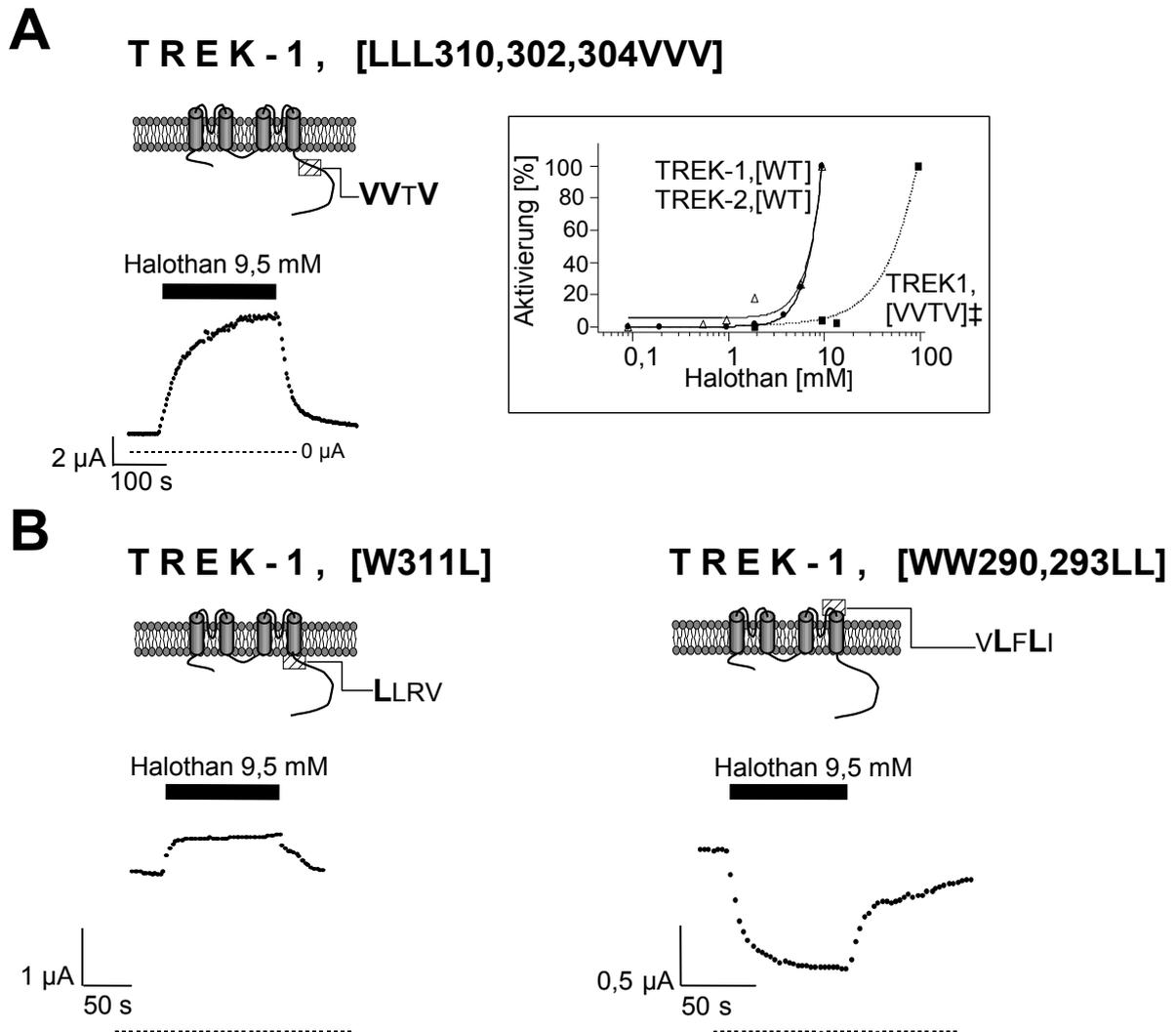


Abb. 3.6: Punktmutationen im Bereich des proximalen C-Terminus und der 4. Transmembrandomäne von *TREK-1* verändern dessen Halothansensitivität. Schematisch dargestellt sind Modelle von *TREK-1* mit Angabe der eingefügten Punktmutation. Darunter befinden sich die jeweiligen Strom-Zeit-Diagramme aus der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme.

(A) Trotz Austausch der hydrophilen Aminosäuren Lysin (K) an den Positionen 301, 302 und 304 gegen die hydrophobere Aminosäure Valin (V) wird *TREK-1*, [LLL310,302,304VVV] durch Halothan aktiviert. Die Einsatzfigur vergleicht die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für Halothan und Wildtyp bzw. Mutante *TREK-1*, [LLL310,302,304VVV] (‡) hier bezeichnet als *TREK-1*, [VVTV] (beide jeweils n=25). (B) Auch nach Austausch der Aminosäure Tryptophan (W) an Position 310 gegen Leucin (L) aktiviert Halothan *TREK-1*, [W311L] (n=9). (C) *TREK-1*, [WW290,293LL], bei dem Tryptophan (W) an Position 290 und 292 ausgetauscht worden ist, wird durch Halothan deutlich inhibiert (n=10).

TREK-1, [LLL310,302,304VVV]

Johansson *et al.* entwarfen mit Hilfe synthetischer Proteine das Modell einer Bindungsstelle für Halothan: Das Grundgerüst basiert auf einem 4- α -Helix-Bündel, welches nach Dimerisation in seinem Inneren eine Art hydrophober Tasche umschließt (Johansson, 1998).

Am Beginn des C-Terminus von *TREK-1* findet man ein Motiv, das mit diesem Modell in seinem Aufbau vergleichbar ist. Im Bereich eines α -helicalen Abschnittes zwischen den Aminosäuren 300 und 307 ähnelt die Abfolge hydrophober und hydrophiler Aminosäuren stark diesem Modell. Bei der Dimerisation der Kanaluntereinheiten nähern sich die hydrophoben Seitenketten einander an. Die hydrophileren Aminosäuren würden mit den dabei verdrängten Wasser-Molekülen eine so entstehende hydrophobe Tasche begrenzen.

Um eine solche Konformation zu zerstören, und somit die Bedeutung dieses Proteinabschnittes für die Halothanbindung klären zu können, wurden die basischen, polaren Aminosäuren Lysin (K) an den Positionen 301, 302 und 304 jeweils gegen die hydrophobere Aminosäure Valin (V) ausgetauscht (Abb. 3.6 A).

1-2 Tage nach Injektion der cRNA von *TREK-1, [LLL310,302,304VVV]* in die *Xenopus*-Oozyten wurde mit den elektrophysiologischen Untersuchungen begonnen. Bei erfolgreicher Expression wird in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme bei *TREK-1, [LLL310,302,304VVV]*, ähnlich wie bei *TREK-1, [Wildtyp]*, ein nur geringer Auswärtsstrom von $1,1 \mu\text{A} \pm 0,5$ ($n=22$) gemessen.

Halothan führt erst in einer Konzentration von 36,7 mM zu einer signifikanten Aktivierung, niedrigere Konzentrationen haben keinen signifikanten Einfluss auf die Kanalaktivität. 9,5 mM Halothan, eine Konzentration, die beim Wildtyp zu Aktivierungen zwischen 44,8 % und 2639,4 % ($n=6$) führt, bewirkt bei der Mutante keine signifikante Aktivierung ($n=18$, $p > 0,1$). Bei einer Konzentration von 36,7 mM Halothan werden Aktivierungen zwischen 581,0 % und 1333,3 % gemessen ($n=7$, $p < 0,05$). Die Aktivierung erreicht - wie auch beim Wildtyp - selbst nach Halothan-Applikation über mehrere Minuten keinen eindeutigen Plateau-Wert, und ist nahezu vollständig reversibel. 9 der 26 in diesem Zusammenhang untersuchten Oozyten zeigen auch auf hohe Konzentrationen des Inhalationsanästhetikums keine Reaktion. 20 der insgesamt 26 Oozyten wurden neben Halothan auch mit Arachidonsäure (AA) bzw. Lysophosphatidylcholin (LPC) umspült. Diese Substanzen

3 Ergebnisse

führen bekanntermaßen zu einer starken Aktivierung der Kanäle der *TREK*-Familie (s.o.). 10 μ M AA bzw. LPC lösen bei allen mit *TREK-1*, [LLL310,302,304VVV] injizierten Oozyten (n=20) eine deutliche Aktivierung aus (keine Abb.). In diesen Fällen ist die Halothansensitivität durch die Mutation beeinträchtigt, während der Kanal auf die beim Wildtyp wirksamen Mengen AA bzw. LPC deutlich aktiviert wird.

***TREK-1*, [W311L] und *TREK-1*, [WW290,293LL]**

Die Idee zu den beiden anderen an *TREK-1* vorgenommenen Mutationen *TREK-1*, [W311L] und *TREK-1*, [WW290,292LL] basiert auf einem anderen Modell. Tang und Xu untersuchten die Wechselwirkungen zwischen Halothan und dem GramicidinA-Kanal (gA). Sie konnten eine spezifische Interaktion von Halothan mit den aromatischen Seitenketten der Aminosäure Tryptophan (W) im gA-Kanal nachweisen (Tang *et al.*, 2002).

Bei *TREK-1*, [W311L] ist die Aminosäure Tryptophan (W) an Position 311, am Übergang zwischen 4. Transmembrandomäne und cytoplasmatischem C-terminalen Ende, durch die Aminosäure Leucin (L) ersetzt (Abb. 3.6 B), bei *TREK-1*, [WW290,293LL] sind die Tryptophane zwischen extrazellulärem Loop und der 4. Transmembrandomäne an den Positionen 290 und 292 jeweils durch ein Leucin (L) ausgetauscht (Abb. 3.6 C). Im Gegensatz zu Tryptophan, welches über einen aromatischen Indolamidring verfügt, ist die Aminosäure Leucin mit einer einfacheren, aliphatischen Seitenkette ausgestattet und so für die von Tang und Xu beschriebenen Interaktionen mit Halothan-Molekülen nicht geeignet.

Bei Expression von *TREK-1*, [W311L] in *Xenopus*-Oozyten über 48 h - 72 h wird in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme über der Oozytenmembran ein typischer K^+ -Auswärtsstrom in Höhe von $4,9 \mu A \pm 1,1$ (n=9) gemessen.

Bei 3 von den 9 untersuchten Oozyten wird der K^+ -Auswärtsstrom auch durch Halothan in einer Konzentration von 9,5 mM bzw. 36,7 mM nicht beeinflusst. Die zur Kontrolle durchgeführten Versuche mit AA in einer beim *TREK-1*, [Wildtyp] maximal aktivierend wirksamen Konzentration führen jedoch auch bei diesen Oozyten zu einer reversiblen Aktivitätszunahme (keine Abb.). Die Messungen zeigen eine reversible Aktivierung des *TREK-1*, [W311L]-Stromes um $17,3 \% \pm 20,1$ (n=8, p = 0,05) bei 9,5 mM Halothan bzw. $27,3 \% \pm 32,5$ (n=10, p < 0,05) bei 36,7 mM Halothan. In diese Auswertung wurden auch die Messungen einbezogen, bei denen Halothan keine bzw. eine nur sehr schwache Aktivierung hervorgerufen hat. Die bei

TREK-1, [Wildtyp], aber auch bei *TREK-1*, [LLL310,302,304VVV] beobachtete Aktivierung um ein Vielfaches des Basiswertes durch hochkonzentrierte Halothan-Lösung > 9,5 mM lassen sich bei dieser Mutante nicht reproduzieren. Die stärkste gemessene Aktivierung beträgt 109,3 % durch 36,7 mM Halothan.

Auch *TREK-1*, [WW290,293LL] wird erfolgreich in der *Xenopus*-Oozyten-Membran exprimiert. Es wird ein auswärtsgerichteter K⁺-Strom von 2,0 µA ± 0,4 (n=11) gemessen. Die Perfusion dieser Oozyten mit 1,9 mM Halothan führt unmittelbar zu einer reversiblen Inhibition des K⁺-Stromes. 9,5 mM Halothan führen bei n=10 Oozyten im Mittel zu einer signifikanten Inhibition um 26,3 % ± 18, (p < 0,05) (Abb. 3.6 C), bei einer Konzentration von 36,7 mM wird der *TREK-1*, [WW290,293LL]-Strom im Mittel um 32,1 % ± 14,6 (n=7, p < 0,05) vermindert. Die Aktivierbarkeit durch AA ist auch bei dieser Chimäre nach wie vor vorhanden (keine Abb.).

3.3 Bedeutung verschiedener Signalwege und Regulationsfaktoren für die Vermittlung der Halothanwirkung auf 2PD-K⁺-Kanäle

3.3.1 Bedeutung der durch Neurotransmitter vermittelten G_{q/11}-abhängigen Inhibition für die Halothanwirkung an TASK-Kanälen

K⁺-Leckleitfähigkeiten in bestimmten Arealen des ZNS (Kortex, Thalamus, Hypothalamus, Hippokampus, monoamine und cholinerge Motoneurone des Hirnstammes etc.) werden durch Neurotransmitter wie Serotonin, Noradrenalin, Substanz P, Thyrotropin-Releasing-Hormon oder Glutamat gehemmt (Goldstein *et al.*, 2001; Millar *et al.*, 2000; Talley *et al.*, 2000). Diese Substanzen entfalten ihre Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Mit ihrer Aktivierung steigen Erregbarkeit und Spontanaktivität der beteiligten Neurone.

Für die Kanäle der *TASK*-Familie *TASK-1* und *TASK-3* konnte bisher ausschließlich eine Kopplung an G_{q/11}-gekoppelte Kanäle gezeigt werden (Bayliss *et al.*, 2001; Talley *et al.*, 2000). Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zur Aktivierung der Phospholipase C β (PLC), die über hydrolytische Spaltung von Phosphatidyl-Inositolbisphosphat (PIP₂) die Synthese der intrazellulären second messenger Inositoltrisphosphat (IP₃) bzw. Diacylglycerin (DAG) vermittelt. Über welchen Signalweg die Hemmung der 2PD-K⁺-Kanäle letztlich erfolgt, bzw. ob die Kanäle evtl. direkt über die G-Protein-Untereinheiten inhibiert werden, ist noch immer nicht geklärt. Es gibt lediglich Hinweise darauf, dass der intrazelluläre PIP₂-Spiegel der entscheidende Faktor der Signaltransduktion ist (Chemin *et al.*, 2003).

Um zu untersuchen, in welchem Maß die Aktivierung der 2PD-K⁺-Kanäle durch Halothan durch diese Rezeptor-vermittelte Inhibition der K⁺-Leitfähigkeit moduliert wird, wird der an den Serotonin-Rezeptor 5HT_{2C} gekoppelte Kanal *TASK-3* gleichzeitig dem Inhalationsanästhetikum Halothan und dem selektiven 5-HT_{2C}-Rezeptor-Agonisten α -Methyl-5-Hydroxytryptamin (α -Met-5-HT), einem Derivat des natürlichen Agonisten Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT), ausgesetzt.

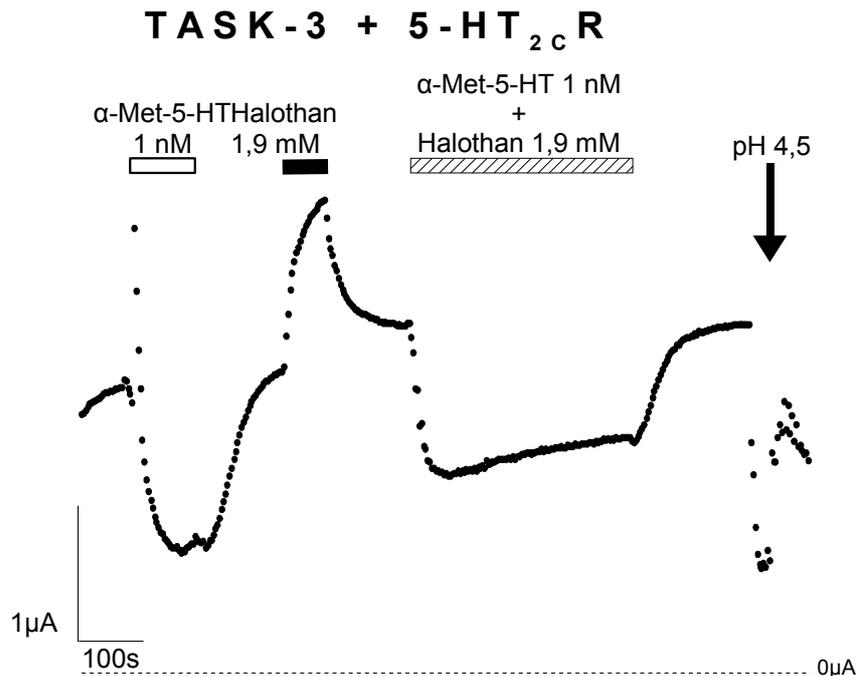
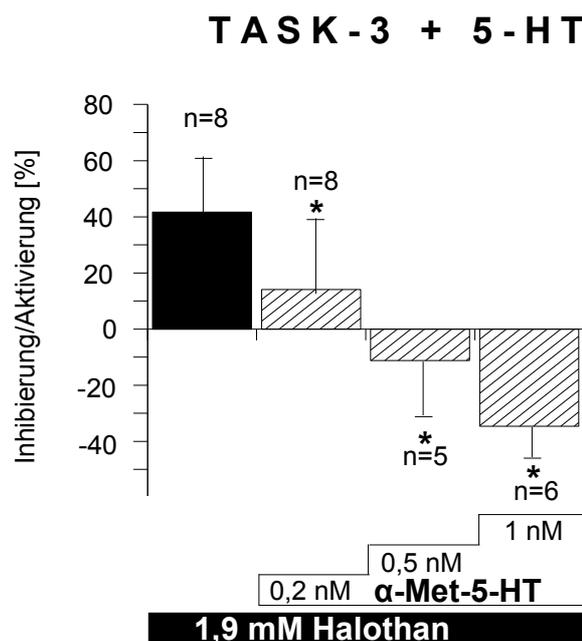
A**B**

Abb. 3.7: Die Wirkung des Inhalationsanästhetikums Halothan auf an Serotonin-Rezeptoren gekoppelte 2PD-K⁺-Kanäle unter dem Einfluss von α -Methyl-5-Hydroxytryptamin(α -Met-5-HT). Abbildung (A) zeigt die Originalableitung an einer mit TASK-3 und dem Serotonin-Rezeptor 5-HT_{2c} koinjizierten Oozyte. 1 nM α -Met-5-HT führt zu einer deutlichen Inhibition des gemessenen Auswärtsstromes. Die Perfusion von 1,9 mM Halothan führt zu einer deutlichen Aktivierung. Bei gleichzeitiger Perfusion beider Substanzen in den zuvor verwendeten Konzentrationen überwiegt der inhibierende Effekt von α -Met-5-HT. Das Balkendiagramm in Abbildung (B) fasst diese Veränderungen der TASK-3-Aktivität nach Perfusion mit 1,9 mM Halothan (schwarz gefärbter Balken), und nach Zusatz von α -Met-5-HT in steigender Konzentration (schraffierte Balken) zusammen. Die Zugabe von α -Met-5-HT führt zu einer signifikanten Veränderung des Stromverhaltens im Vergleich zu den Messergebnissen unter reiner Halothan-Lösung. * bezeichnet ein Signifikanzniveau $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

Für die Kopplung des 2PD-K⁺-Kanals *TASK-3* an den 5-HT_{2C}-Rezeptor werden in die *Xenopus*-Oozyten nacheinander jeweils die gleiche Menge cRNA von *TASK-3* und 5-HT_{2C}-Rezeptor injiziert. 1-2 Tage nach der Injektion wird über der Oozytenmembran ein Auswärtsstrom in Höhe von $4,6 \mu\text{A} \pm 2,9$ (n=8) gemessen. Eine ausreichende Expression von *TASK-3* wird durch Inhibition dieses Auswärtsstromes nach Absenkung des pH auf 4,5 und Aktivierung bei Perfusion mit Halothan in einer Konzentration von 1,9 mM ($55,2 \% \pm 31,1$; n=8) überprüft. Um auch die erfolgreiche Expression des Serotonin-Rezeptors 5-HT_{2C} bzw. dessen Kopplung an den 2PD-K⁺-Kanal *TASK-3* nachzuweisen, werden die Oozyten im Laufe der Messungen mit α -Met-5-HT perfundiert. α -Met-5-HT führt bei diesen Oozyten konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Inhibition des *TASK-3*-Stromes ($p < 0,05$) (Abb. 3.7 A). Perfusion einer α -Met-5-HT-Lösung in einer Konzentration von 0,2 nM führt bei n=5 Messungen zu einer Inhibition des an den 5-HT_{2C}-Rezeptor gekoppelten *TASK-3* um $44 \% \pm 4,2$. Der zu Beginn der α -Met-5-HT-Perfusion regelmäßig ableitbaren sprunghaften Stromzunahme (Abb. 3.7 A) liegt ein durch Anstieg der intrazellulären Ca⁺⁺-Konzentration aktivierter Chlorid-Strom zugrunde. Für die hier durchgeführten Experimente hat dieser Strom keine Bedeutung. Bei Aktivierung des 5-HT_{2C}-Rezeptors durch α -Met-5-HT in physiologisch relevanter Konzentration wird eine Aktivierung durch Halothan abgeschwächt bzw. vollständig unterdrückt. Als Referenzwert dient die an den 8 hier untersuchten Oozyten bestimmte Aktivierung des *TASK-3*-Stromes durch 1,9 mM Halothan um $55,2 \% \pm 31,1$ (n=8, $p < 0,05$). Dieser Halothaneffekt wird durch die α -Met-5-HT-Wirkung dosisabhängig beeinflusst (für alle verwendeten Konzentrationen signifikanter Unterschied zu den unter reiner Halothan-Perfusion bestimmten Werten mit $p < 0,05$). Fügt man zu der 1,9 mM Halothan-Lösung α -Met-5-HT entsprechend einer Konzentration von 0,2 nM hinzu, wird im Mittel eine Aktivierung von jetzt nur noch $14,3 \% \pm 26,9$ (n=8) (Abb. 3.7 B) gemessen. Dabei sind bei einem Teil der Messungen an unterschiedlichen Oozyten Aktivierungen, bei anderen Messungen mit dem gleichen Lösungsgemisch jedoch auch Inhibierungen des *TASK-3*-Stromes zu beobachten. Eine Lösung mit 1,9 mM Halothan im Gemisch mit einer α -Met-5-HT in einer Konzentration von 0,5 nM führt im Schnitt zu einer Inhibition des *TASK-3*-Stromes um $11,2 \% \pm 19,3$ (n=5) (Abb. 3.7 B). Der K⁺-Auswärtsstrom wird in dieser Konzentration bei den einzelnen Messungen entweder gehemmt oder bleibt unverändert. α -Met-HT in einer Konzentration von 1 nM als Zusatz einer 1,9 mM

Halothan-Lösung führt bei n=6 Messungen ausschließlich zur Inhibition des an der Oozytenmembran gemessenen Auswärtsstromes um gemittelt 34,6 % ± 10,9 (Abb.3.7 A und B).

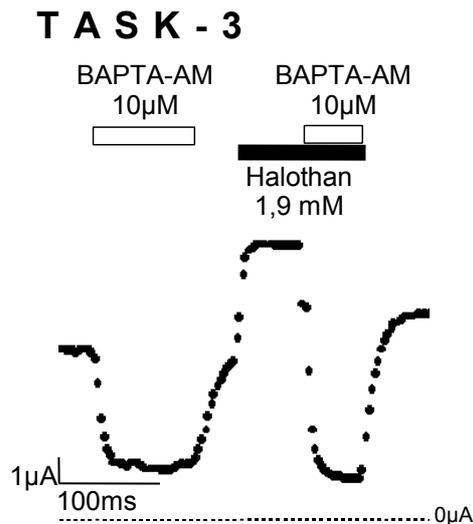
3.3.2 Einfluss der Ca⁺⁺-Homöostase auf den Effekt von Halothan auf verschiedene 2PD-K⁺-Kanäle

Calcium (Ca⁺⁺) ist einer der wichtigsten second messenger eukaryonter Zellen. Neben seiner Funktion als Integrator der elektromechanischen Kopplung kontraktiler Zellen kommt ihm auch eine wichtige Bedeutung bei Signalvermittlung und -modulation in der neuronalen Informationsvermittlung zu.

Neurotransmitterausschüttung wie auch Membranleitfähigkeit der Neuronen werden durch Ca⁺⁺ entscheidend reguliert: Als Bestandteil Rezeptor-vermittelter Signaltransduktion, wie bei den G_{q/11}-gekoppelten Rezeptoren, oder auch über direkte Wirkung an Ionenkanälen, wie z.B. bei den Ca⁺⁺-abhängigen K⁺-Kanälen.

Inhalationsanästhetika führen zu einem Anstieg der intrazellulären Ca⁺⁺-Konzentration in Nervenzellen (Franks J.J. *et al.*, 1998; Gomez *et al.*, 2002). Die Ursache dieses Phänomens ist, genauso wie seine Bedeutung für die Wirkungsvermittlung der Inhalationsanästhetika, unklar.

A



B

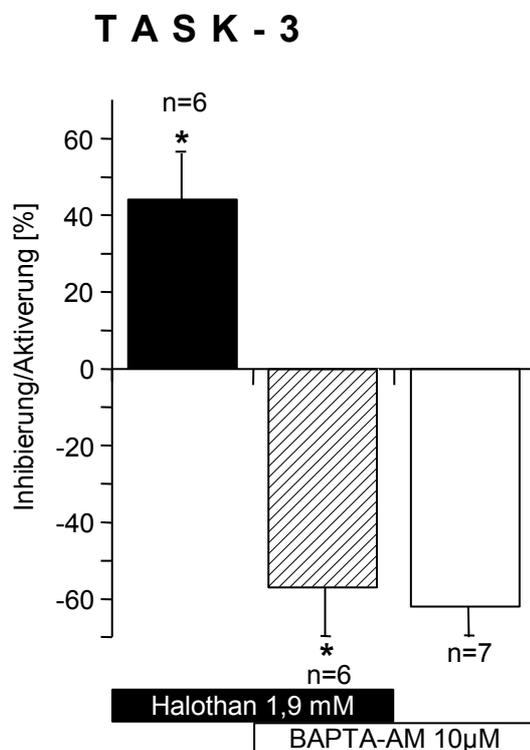


Abb. 3.8: Die Wirkung des Inhalationsanästhetikums Halothan auf 2PD-K⁺-Kanäle unter dem Einfluss des intrazellulären Calcium-Chelators BAPTA-AM.

Abbildung (A) zeigt eine Originalableitung aus Messungen an TASK-3. 10 µM BAPTA-AM führen zu einer Inhibition des Auswärtsstromes, die Perfusion von 1,9 mM Halothan führt zu einer Zunahme dieses Stromes. Bei gleichzeitiger Perfusion beider Substanzen in den zuvor verwendeten Konzentrationen wird annähernd der Effekt der reinen BAPTA-AM-Lösung wieder erreicht. Das Balkendiagramm in Abbildung (B) fasst die Veränderungen der TASK-3-Aktivität nach Perfusion mit 1,9 mM Halothan (schwarz gefärbter Balken), 1,9 mM Halothan mit 10 µM BAPTA-AM (schraffierter Balken) und 10 µM BAPTA-AM (weißer Balken) zusammen. Die Effekte für sich genommen, sind jeweils signifikant ($p < 0,05$), zwischen der Inhibition durch BAPTA bzw. BAPTA/Halothan besteht jedoch kein signifikanter Unterschied ($p > 0,1$).

Um die Bedeutung der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration für die Aktivierung der 2PD-K^+ -Kanäle durch Halothan zu untersuchen, wurden Oozyten, die den 2PD-K^+ -Kanal *TASK-3* exprimieren, dem Ca^{++} -Chelator BAPTA-AM ausgesetzt (Abb. 3.8 A). BAPTA ist in der AM-Form verestert und damit lipophil und membranpermeabel. In der Zelle wird der Ester durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert. In der unveresterten Form ist BAPTA nicht mehr membranpermeabel und es kommt zu einer Akkumulation in der Zelle.

10 μM BAPTA-AM vermindern die K^+ -Leitfähigkeit von *TASK-3* um $61,8 \% \pm 8,1$ ($n=7$, $p < 0,05$). Ein Gemisch aus 10 μM BAPTA-AM und 1,9 mM Halothan führt noch immer zu einer Inhibition um $56,8 \pm 12,6$ ($n=6$, $p < 0,05$) (Abb. 3.8 A und B). Die Werte aus Messungen mit reiner BAPTA-AM-Lösung und dem Gemisch aus BAPTA-AM und Halothan unterscheiden sich dabei nicht signifikant ($p > 0,1$). Eine reine Halothan-Lösung führt bei den hier untersuchten Oozyten im Vergleich dazu zu einer Aktivierung des *TASK-3*-Stromes um $44 \% \pm 13$ ($n=3$, $p < 0,05$) (Abb. 3.8 B)

Auch *THIK-1*, der sich strukturell und funktionell von den *TASK*-Kanälen grundlegend unterscheidet, wird durch 10 μM des Ca^{++} -Chelatoren um $23,1 \% \pm 7,4$ inhibiert ($n=6$). Ein unspezifischer Effekt von BAPTA-AM auf die Oozyten konnte zum einen durch Messung an nicht-injizierten Oozyten, aber auch durch Ableitungen an mit *TASK-1*, [$\Delta 243-248$] injizierten Oozyten ausgeschlossen werden: Diese Oozyten werden durch 10 μM BAPTA-AM nicht inhibiert (keine Abb.).

3.3.3 Der extrazelluläre pH-Wert und die Halothanwirkung auf *TASK-1*

Ein weiterer wichtiger Regulationsfaktor der 2PD-K^+ -Kanäle ist der pH-Wert sowohl des extra- wie auch des intrazellulären Milieus. Im Fall von *TASK-1* führt eine Absenkung des extrazellulären pH zu zunehmender Inhibition des K^+ -Auswärtsstromes (Duprat *et al.*, 1997).

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert im ZNS bei einer globalen Ischämie auf Werte zwischen 6,2 und 6,4 abfallen kann (Chopp *et al.*, 1987). Neben der üblicherweise verwendeten ND96-Lösung mit einem den physiologischen Bedingungen entsprechenden pH von 7,4 als Badlösung bzw. als Lösungsmedium für Halothan, wurde in den folgenden Messungen zu diesen Zwecken auch ND96-Lösung mit einem pH von 6,8 verwendet. Eine Absenkung des pH-Wertes der Badlösung in der Messkammer von 7,4 auf 6,8 führt zu einer

3 Ergebnisse

Absenkung des Basisstromes um $64,4 \% \pm 4,4$. Während eine Perfusion von 1,9 mM Halothan bei einem pH-Wert von 7,4 den Basisstrom bei diesen Messungen um $26,5 \% \pm 8,7$ ($n=5$, $p < 0,05$) steigert, wird der *TASK-1*-Strom durch Halothan unter azidotischen Bedingungen ($\text{pH} = 6,8$) nicht signifikant ($n=4$, $p > 0,1$) verändert (Abb. 3.9).

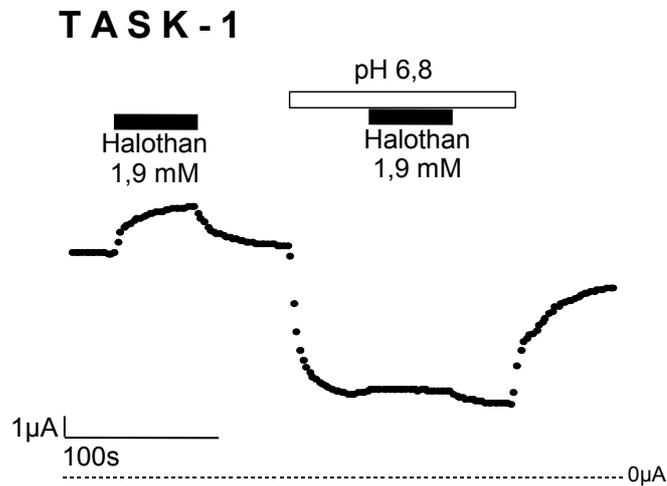


Abb. 3.9: Unter azidotischen Bedingungen verändert Halothan den Aktivitätszustand von *TASK-1* kaum.

TASK-1 wird Halothan unter unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt. Bei $\text{pH} 7,4$ führen 1,9 mM Halothan zu einer deutlichen Aktivierung des *TASK-1*-Stromes. Senkt man den pH -Wert von Bad- und Spüllösung auf 6,8, sinkt die Grundaktivität des 2PD- K^+ -Kanals und wird durch die gleiche Konzentration Halothan nicht signifikant beeinflusst.

3.4 Aktivierung und Inhibierung der 2PD-K⁺-Kanäle durch Halothan

3.4.1 Konzentrationsabhängig entgegengesetzte Effekte von Halothan auf die 2PD-K⁺-Kanäle der TASK Familie

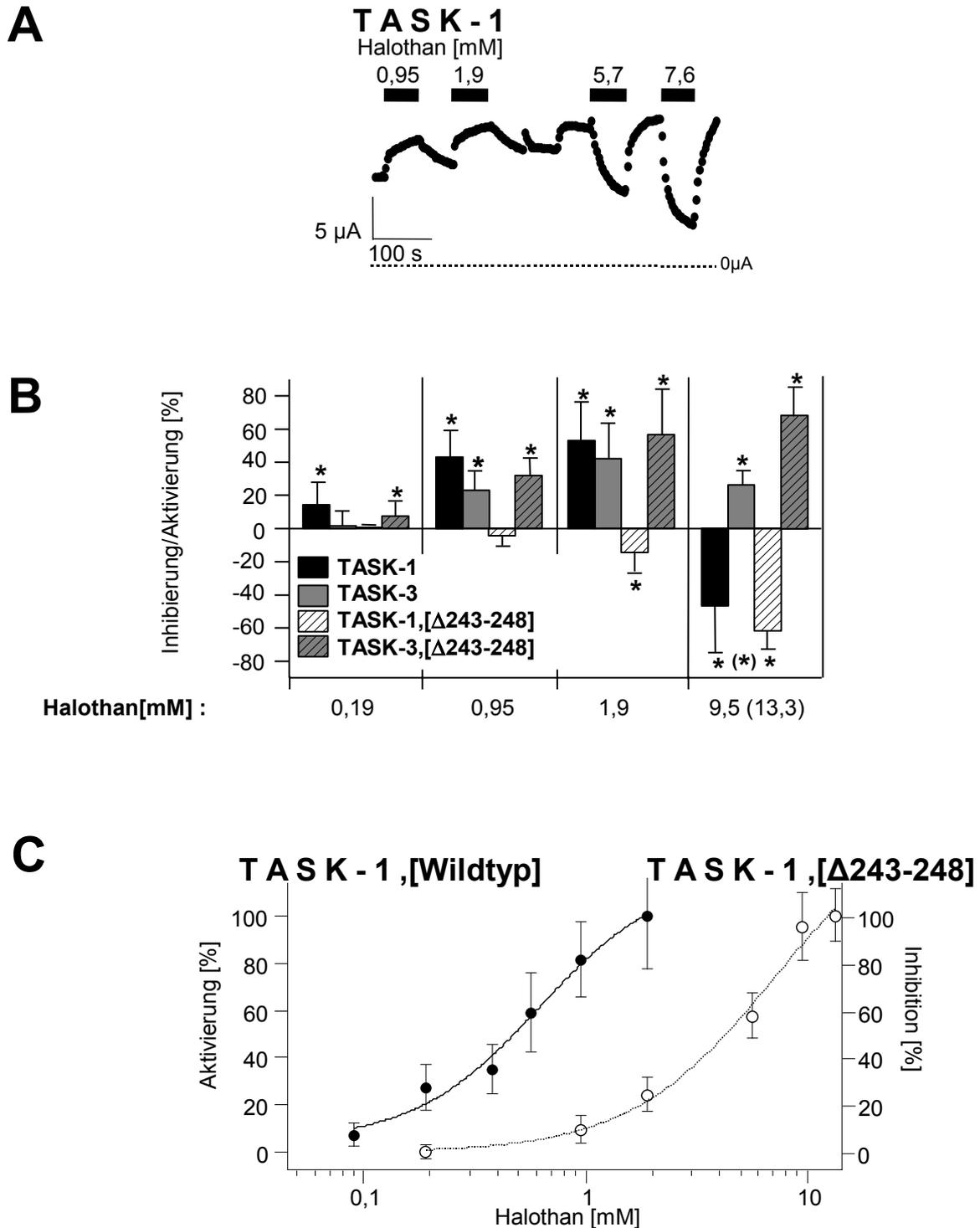


Abb. 3.10: Halothan führt bei den 2PD-K⁺-Kanälen *TASK-1* und *TASK-3* konzentrationsabhängig zu unterschiedlichen Effekten.

3 Ergebnisse

(A) Während die Stromamplitude von *TASK-1* durch 0,95 mM und 1,9 mM Halothan deutlich gesteigert wird, führen 5,7 mM und 9,5 mM Halothan zu einer deutlichen Inhibition. Das Balkendiagramm in (B) stellt die prozentualen Absolutwerte der Aktivierung bzw. Inhibition der Stromamplitude von *TASK-1*, [Wildtyp], *TASK-3*, [Wildtyp], *TASK-1*, [$\Delta 243-248$] und *TASK-3*, [$\Delta 243-248$] durch Halothan in den angegebenen Konzentrationen einander gegenüber (der in Spalte 4 in Klammern angegebene Wert gilt für die beiden Deletionsmutanten *TASK-1*, [$\Delta 243-248$] und *TASK-3*, [$\Delta 243-248$]). * bezeichnet ein Signifikanzniveau $p < 0,05$. Abbildung. (*) Die Inhibition von *TASK-1*, WT bzw. *TASK-1*, Mutante unterscheiden sich nicht signifikant ($p > 0,1$) (C) vergleicht die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Halothan und *TASK-1*, [Wildtyp] bzw. *TASK-1*, [$\Delta 243-248$]. Der Vergleich dieser beiden Kurven verdeutlicht, dass die durch Halothan vermittelte Inhibition der Deletionsmutante *TASK-1*, [$\Delta 243-248$] in einem anderen Konzentrationsbereich stattfindet als die Aktivierung des Wildtyps ($EC_{50} = 0,45 \text{ mM} \pm 0,22$ für den Wildtyp bzw. $4,17 \text{ mM} \pm 1,14$ für die Deletionsmutante). Für alle gezeigten Werte gilt $n \geq 3$.

Setzt man *TASK-1* Halothankonzentrationen $> 1,9 \text{ mM}$ aus, wird der bis dahin durch das Inhalationsanästhetikum aktivierte 2PD- K^+ -Kanal (s. 3.1) plötzlich inhibiert (Abb. 3.10 A). Eine maximale Inhibition stellt sich ein bei Halothan in einer Konzentration von 5,7 mM. Der Basisstrom wird in dieser Konzentration um $55,1 \% \pm 8,2$ ($n=5$, $p < 0,05$) reduziert.

Um diese unterschiedlichen Reaktionen von *TASK-1* auf Halothan getrennt voneinander untersuchen zu können, wurden weitere Messungen an der bereits in 3.2.1 beschriebenen Deletionsmutante *TASK-1*, [$\Delta 243-248$] durchgeführt. Halothan führt bei dieser Mutante in einer Konzentration $\leq 0,95 \text{ mM}$ zu keiner signifikanten Veränderung der Grundaktivität. Die Perfusion von 1,9 mM Halothan bewirkt jedoch bereits eine signifikante Inhibition des K^+ -Auswärtsstromes um $14,4 \% \pm 7,9$ ($n=17$, $p < 0,05$). Bei steigender Halothankonzentration zeigt sich schließlich eine dosisabhängig zunehmende Inhibition des Auswärtsstroms. 13,3 mM Halothan inhibieren *TASK-1*, [$\Delta 243-248$] um $60,4 \% \pm 11,5$ ($n=10$, $p < 0,05$) (Abb. 3.10 B). Aus der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für *TASK-1*, [$\Delta 243-248$] wurde für die Inhibition eine EC_{50} von $4,17 \text{ mM} \pm 1,14$ bei einem Hill-Koeffizienten von $1,32 \pm 0,61$ ermittelt. Im Bereich der EC_{50} der Inhibition der Deletionsmutante sind auch beim Wildtyp signifikante Inhibitionen durch Halothan erreicht worden, die sich von den beim Wildtyp ermittelten Inhibitionswerten nicht signifikant unterscheiden. Es handelt sich also nicht um einen durch die Mutation generierten Effekt. Die Gegenüberstellung der beiden Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Abb. 3.10 C veranschaulicht, dass Aktivierung von *TASK-1* bzw. Inhibition von *TASK-1*, [$\Delta 243-248$] durch Halothan in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen erfolgen und sich die beiden Effekte im Bereich von 1,9 mM überlagern. Die entgegengesetzte Wirkung von Halothan beruht demnach nicht auf strukturellen Veränderungen im Kanalprotein, sondern hängt von der eingesetzten Substanzmenge ab. *TASK-3* wird auch durch

Halothankonzentrationen $> 1,9$ mM aktiviert. Das Ausmaß dieser Aktivierung geht jedoch mit zunehmender Halothankonzentration wieder zurück. $13,3$ mM Halothan führen zu einer Aktivierung von nur noch $26,1 \% \pm 8,6$ ($n=10$) (Abb. 3.10 B). Eine Inhibition, wie bei *TASK-1* beschrieben, kann für *TASK-3* mit keiner der verwendeten Konzentrationen bis $19,0$ mM erzielt werden. Die Messungen an der Deletionsmutanten *TASK-3*, [$\Delta 243-248$] zeigen, dass *TASK-3* auch nach Entfernung des 6-Aminosäurenmotivs VLRFLT noch durch Halothan aktiviert werden kann (Abb. 3.5 A). Bei Halothan in Konzentrationen $\leq 1,9$ mM zeigen die Messwerte keinen signifikanten Unterschied zu den bei *TASK-3*, [*Wildtyp*] erzielten Werten ($0,6$ mM: $p > 0,05$; $0,95$ mM bzw. $1,9$ mM: $p > 0,1$). Im Gegensatz zu *TASK-3*, [*Wildtyp*] nimmt das Ausmaß der Aktivierung jedoch bei Perfusion von Halothan in einer Konzentration $> 1,9$ mM weiter zu (Abb. 3.8B). Für $n=20$ erhält man bei *TASK-3*, [$\Delta 243-348$] unter Perfusion von $1,9$ mM Halothan eine durchschnittliche Aktivitätssteigerung um $56,6 \% \pm 28,5$. Steigert man die Konzentration der Halothan-Lösung auf $13,3$ mM, führt dies zu einer Aktivierung des Basisstromes um $68,3\% \pm 16,8$ ($n=5$) (Abb. 3.10 B). Die Aktivierungswerte der Mutante unterscheiden sich in diesen Konzentrationsbereichen signifikant von den Messwerten bei *TASK-3*, [*Wildtyp*].

Auch bei *TASK-3* scheint Halothan in höheren Konzentrationen parallel mehrere, wohl gegensätzliche Veränderungen am Kanalprotein auszulösen. Beim Wildtyp kommt es durch die Überlagerung dieser verschiedenen Mechanismen zu der beobachteten Reduktion des Aktivierungsgrades bei höheren Konzentrationen. Durch Entfernung des 6-Aminosäurenmotivs wurde diese Überlagerung wenigstens zum Teil bereinigt: hier nimmt der Aktivierungsgrad kontinuierlich mit der Halothankonzentration zu, die die Aktivierung limitierende inhibierende Komponente fällt mit Entfernung der 6 Aminosäuren weg.

3.4.2 Inhibition von *TREK-1* durch Halothan nach Austausch bestimmter Aminosäuren

Bei der Suche nach einer Bindungsstelle für Halothan am C-terminalen Ende von *TREK-1* wurde u.a. die Mutante *TREK-1*, [WW290,293LL] generiert (s. 3.2.2). *TREK-1*, dessen Strom durch Halothan um das bis zu 20-fache gesteigert werden kann (s. 3.1), wird nach diesen zwei Punktmutationen am Übergang zwischen Extrazellulär-Loop und vierter Transmembrandomäne durch Halothan nun inhibiert (Abb. 3.6 C). *TREK-1*, [WW290,293LL]-Strom wird durch 9,5 mM Halothan um durchschnittlich $26,3 \% \pm 18,3$ ($n=10$, $p < 0,05$) reduziert. 36,7 mM führen zu einer Inhibition um $32,1 \% \pm 14,6$ ($n=7$, $p < 0,05$). Geringere Konzentrationen führen zu keiner Veränderung der Stromamplitude. Eine Inhibition des *TREK-1* Wildtyps kann dagegen mit keiner der eingesetzten Halothankonzentrationen erzielt werden.

4 Diskussion

4.1 Molekulare Grundlagen der Wirkung von Anästhetika auf die 2PD-K⁺-Kanäle

Der Effekt des Inhalationsanästhetikums Halothan auf die 2PD-K⁺-Kanäle lässt sich an mit entsprechender cRNA injizierten *Xenopus*-Oozyten in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ohne Schwierigkeiten darstellen. So eindeutig sich dieser Effekt aufzeichnen und auch reproduzieren lässt, so schwierig gestaltet sich die Frage nach den diesen Beobachtungen zugrunde liegenden Mechanismen.

Die Bindung der Anästhetika an die bekannten Zielproteine unterliegt einer sehr schnellen Kinetik. Allgemein muss man angesichts ihrer geringen Moleküloberfläche, ihrer Hydrophobizität und ihrer relativ inerten Eigenschaften von einer schwachen, kurz dauernden chemischen Bindung ausgehen (Eckenhoff M.F. *et al.*, 2002; Eckenhoff, R.G. *et al.*, 1997; Johansson, 1998; Mashour *et al.*, 2005). Da eine Aktivierung von *TASK*- und *TREK*-Kanälen auch im *outside-out-patch* reproduzierbar ist (Patel *et al.*, 1999), ist eine Beteiligung von second-messenger vermittelter Signaltransduktion unwahrscheinlich, und man kann von einer direkten Wechselwirkung mit dem Protein ausgehen.

4.1.1 Halothan-vermittelte Aktivierung von *TASK-1* und *TASK-3* über eine Gate-Struktur

Indem man den Kanälen sukzessive unterschiedliche Abschnitte aus dem Protein entfernte und sie bezüglich Grundaktivität und Sensitivität gegenüber den verschiedenen Regulatoren untersuchte, konnte man mehrere für Funktion und Regulation der 2PD-K⁺-Kanäle entscheidende Abschnitte isolieren (Patel *et al.* 1999; Talley *et al.* 2002). Ergebnis dieser Arbeiten ist u.a. die Identifizierung eines 6-Aminosäuren-Abschnittes von *TASK-1*, der in gleichem Maße für die Rezeptor-vermittelte Inhibition wie auch für die durch Inhalationsanästhetika wie Halothan bewirkte Aktivierung entscheidend sein soll (Talley *et al.*, 2002). Dieser Abschnitt befindet sich unmittelbar am Übergang von Transmembrandomäne 4 und dem intrazellulären C-Terminus und enthält kein klassisches Phosphorylierungs-Motiv, das als Zielstruktur Rezeptor-vermittelter Signaltransduktion dienen könnte (Talley *et al.*, 2002).

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass für eine Aktivierung von *TASK-1* durch Halothan das Aminosäuremotiv VLRFMT an Position 243-248 essentiell ist. Seine Entfernung beeinträchtigt zwar nicht die Grundaktivität von *TASK-1*. Eine Aktivierung durch Halothan in den beim Wildtyp wirksamen Konzentrationen ist jedoch nicht mehr möglich. Dieses Motiv kommt als Interaktionsstelle für Halothan in Frage, an die der Wirkstoff direkt bindet oder mittels derer der Wirkstoff über mehr oder weniger spezifische Wechselwirkungen mit dem Kanalprotein oder auch mit benachbarten Strukturen zu den beobachteten Veränderungen der Kanalaktivität führt. Ohne diese Interaktionsstelle ist der Kanal zwar noch intakt und durch extrazelluläre pH-Absenkung auch noch regulierbar, gegenüber Halothan jedoch insensitiv. Die über $G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren vermittelte Inhibition, in diesem Fall der Serotonin-Rezeptor 5-HT_{2C}, ist ebenfalls nicht mehr möglich (keine Abb.), dieser Abschnitt ist somit bei *TASK-1* Bestandteil beider Regulationswege.

Es muss natürlich auch die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass mit Entfernung der 6 Aminosäuren der C-Terminus in seiner Konformation derart verändert wurde, dass andere Interaktions- oder Bindungsstellen in diesem Bereich zerstört worden sind. *TASK-1*, [Δ 249-390RSSV] kann aber durch Halothan weiterhin aktiviert werden. Der überwiegende Anteil des intrazellulären C-terminalen Kanalabschnittes hat also für die Regulation durch Halothan keine Bedeutung. Die im Vergleich zum Wildtypen signifikant höhere Halothansensitivität der Deletionsmutanten kann in diesem Sinne mit einer besseren Zugänglichkeit der Interaktionsstelle VLRFMT für seine Regulatoren erklärt werden.

TASK-3, der andere 2PD-K⁺-Kanal aus der *TASK*-Familie, weist gegenüber *TASK-1* eine Sequenzhomologie > 50 % auf (Duprat *et al.* 1997; Talley *et al.*, 2000) und enthält an vergleichbarer Stelle das Motiv VLRFLT, das sich nur an einer Aminosäureposition vom entsprechenden Motiv bei *TASK-1* unterscheidet. Diese Arbeit konnte zeigen, dass *TASK-3* nach Deletion dieser 6 Aminosäuren weder Grundaktivität noch Aktivierbarkeit durch Halothan verloren hat. Die Sensitivität gegenüber Halothan, ausgedrückt durch die in der Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelte EC₅₀, ist gegenüber dem Wildtyp um das 1,8 fache verstärkt. Angesichts der auffallenden Ähnlichkeiten der beiden Kanäle bezüglich Primärstruktur und Regulierbarkeit erscheint die Vorstellung, dass beide Kanäle durch das gleiche Molekül auf unterschiedlichem Weg bzw. über unterschiedliche Bindungsstellen aktiviert werden, unwahrscheinlich.

Eine Regulation durch den $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptor 5-HT_{2C} war auch bei *TASK-3*, [$\Delta 243-248$] nicht mehr möglich (keine Abb.). Damit kann praktisch ausgeschlossen werden, dass dieses Motiv identische Bedeutung für Halothanwirkung und Rezeptor-vermittelte Inhibition bei den untersuchten *TASK*-Kanälen besitzt.

Nach Austausch der Aminosäure an Position 247 im Protein von *TASK-3* bleibt *TASK-3*, [*L247M*] nach wie vor durch Halothan aktivierbar, und auch die Kopplung an den 5HT_{2C}-Rezeptor wird nicht beeinträchtigt (keine Abb.). Die Bedeutung dieser Aminosäure für die Regulation von *TASK-3* bzw. für den untersuchten Protein-Abschnitt ist also eher als gering einzuschätzen. Die Unterschiede im Verhalten der beiden Deletionsmutanten *TASK-1*, [$\Delta 243-248$] und *TASK-3*, [$\Delta 243-248$] lassen sich nicht durch diesen Unterschied in der Primärstruktur erklären.

Der untersuchte Kanalabschnitt besitzt somit wohl kaum die Funktion eines spezifischen Bindungsmotives für Halothan. Das Motiv könnte vielmehr Bestandteil einer Struktur sein, die als sog. Gate den Öffnungszustand der Pore mitbestimmt: Abhängig nicht nur von der Tertiär- bzw. Quartärstruktur der beiden Untereinheiten des funktionellen Kanals, sondern auch vom Aufbau der ihn umgebenden Lipid-Doppelschicht-Membran und der durch Ladung und Konformation der einzelnen Aminosäuren-Seitenketten bestimmten Proteindynamik. Die Struktur eines solchen Gates kann mit den in dieser Arbeit angewendeten Methoden nicht geklärt werden. Genauere Analysen zu Tertiär- bzw. Quartärstruktur funktioneller 2PD-K⁺-Kanäle, bspw. mittels Röntgen-Strukturuntersuchungen, fehlen bisher. Mögliche Erklärungen liefern jedoch Ergebnisse aus Strukturanalysen der übrigen K⁺-Kanäle. Allen K⁺-Kanälen gemeinsam ist der Aufbau der Pore, über die die K⁺-Ionen die Membran passieren. Dieser Bereich, gebildet an der Kontaktstelle der am funktionellen Kanal beteiligten Untereinheiten, wird geformt von den sog. inneren Helices der einzelnen Untereinheiten, die sich auf der dem Zellinneren zugewandten Seite der Membran zusammenlagern, den Poren-Helices, die auf der extrazellulären Seite den Kontakt zu den inneren Helices herstellen, sowie dem auf der extrazellulären Seite der Membran gelegenen Selektivitätsfilter (Doyle *et al.*, 1998, Doyle 2004; Hille, 1992). Der Ionenfluss über diese Pore wird dabei nicht nur durch den elektrochemischen Gradienten über die Membran bestimmt, sondern kann auch als Reaktion auf einen Stimulus aktiv moduliert werden, indem die Weite der Porenöffnung verändert wird. Die für diese Regulation verantwortlichen Proteinabschnitte liegen überwiegend außerhalb der hochkonservierten Porenregion, also in den Abschnitten, in denen die einzelnen K⁺-Kanäle vergleichsweise geringe strukturelle Gemeinsamkeiten

4 Diskussion

aufweisen. Die Regulation über ein Gate konnte bspw. für verschiedene spannungsabhängige K^+ -Kanäle gezeigt werden. Grundlage dieses Vorgangs ist wahrscheinlich die Verlagerung transmembraner Abschnitte innerhalb der Lipidmembran, die die Porenöffnung im inaktiven Zustand verschließen und im Falle einer Aktivierung freigeben (Ahern *et al.*, 2004, Doyle 2004; Kuo *et al.*, 2003). Hydrophobe Seitenketten im Bereich bestimmter Transmembransegmente sind für die Gate-Funktion essentiell. Sie regulieren den Porendurchmesser indirekt, indem sie den Wasser-Durchtritt begrenzen (Doyle, 2004). Weder C- noch N-Terminus allein kann eine solche Funktion bei *TASK-1* oder *TASK-3* zugesprochen werden. Das konnte anhand der verschiedenen Deletionsmutanten auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Das besprochene 6-Aminosäurenmotiv, als strukturelles Korrelat eines solchen Gates, kann aber über Interaktion mit anderen, nicht zwingend angrenzenden Proteinabschnitten an Öffnung bzw. Schließung der Kanalpore beteiligt sein. Für die Halothan-vermittelte Inhibition der Ca^{++} -abhängigen K^+ -Kanäle wurde bspw. ein Aminosäurenabschnitt im extrazellulären Bereich der Porendomäne als essentiell identifiziert, wobei die Halothansensitivität über Wechselwirkungen mit dem C-Terminus zusätzlich wahrscheinlich allosterisch reguliert wird (Hashiguchi-Ikeda *et al.*, 2003). Aus der Deletion eines einzelnen, isolierten Proteinabschnittes können daher nur begrenzt Aussagen zur grundsätzlichen Bedeutung dieses Bereiches für den untersuchten Kanal und ähnliche Kanäle aus der gleichen Untergruppe getroffen werden. Die gleiche Mutation bei zwei miteinander verwandten und im Aufbau vergleichbaren Kanälen wie *TASK-1* und *TASK-3* muss also nicht unbedingt die gleichen funktionellen Veränderungen hervorrufen.

Die Tatsache, dass *TASK-1*, [Δ 243-248] durch Halothan in Konzentrationen $> 1,9$ mM deutlich inhibiert wird, weist darauf hin, dass der Kanal mehrere Interaktionsstellen für Halothan besitzt, die unterschiedliche Effekte vermitteln. Uneinheitliche Ergebnisse bei Messungen an *TASK-1*, [Wildtyp] bei Halothan $> 1,9$ mM lassen sich so auf die in diesem Konzentrationsbereich zur Geltung kommende gleichzeitige Aktivierung und Inhibition von *TASK-1* durch Halothan zurückführen. Für eine Vielzahl anderer Membranproteine, darunter auch ligandenabhängige Ionenkanäle wie z.B. den serotonergen 5-HT₃-Rezeptor, den GABA_A-Rezeptor oder den ionotropen purinergen P2X-Rezeptor, konnte gezeigt werden, dass ein und das selbe Inhalationsanästhetikum sowohl aktivierend wie auch inhibierend wirken kann (Dilger *et al.*, 2002). Zeitkonstanten von Aktivierung und Inhibition von *TASK-1*, [Wildtyp] unterscheiden sich nicht signifikant ($p > 0,05$, keine Abb.). Dies spricht

dafür, dass beiden Effekten, auch wenn sie über unterschiedliche Interaktionsstellen vermittelt werden, der gleiche Wirkmechanismus zugrunde liegt. *TASK-1*, [Δ 249-390RSSV], bei dem der gesamte C-Terminus bis auf das für die Aktivierung durch Halothan erforderliche Motiv entfernt wurde, wird auch bei hohen Halothankonzentrationen $> 1,9$ mM nicht inhibiert. Entweder ist der C-Terminus essenziell für die Inhibition durch Halothan, oder der aktivierende Effekt von Halothan dominiert bei der sensitiveren Mutante die Inhibition.

Die Messungen an *TASK-3*, [Wildtyp] mit Halothan $> 1,9$ mM deuten ebenfalls auf eine Überlagerung zweier Effekte hin. Das Ausmaß der Aktivitätssteigerung ist maximal bei $1,9$ mM, die Aktivierung nimmt oberhalb dieser Konzentrationen wieder deutlich ab. Eine Trennung dieser beiden Effekte wie bei *TASK-1* ist allerdings nicht möglich, da auch *TASK-3*, [Δ 243-248] weiterhin durch Halothan aktiviert wird.

4.1.2 Identifikation mehrerer an der Aktivierung durch Halothan beteiligter Proteinabschnitte bei *TREK-1*

Für den 2PD-K⁺-Kanal *TREK-1* wurde in den Arbeiten von Talley und Patel (s.o) ebenfalls der C-Terminus als entscheidender Abschnitt für die Aktivierung von Halothan identifiziert. Die Eigenschaft der Halothansensitivität ist jedoch nicht beliebig austauschbar. Eine Chimäre von *TREK-1*, bei der der C-Terminus durch den entsprechenden Abschnitt von *TASK-1* ersetzt wurde, blieb, wie die Deletionsmutante *TREK-1*, [Δ 322], insensitiv gegenüber Halothan. Der Wirkung von Halothan auf *TREK-1* liegen höchstwahrscheinlich andere Wirkmechanismen zugrunde als der auf *TASK-1* oder *TASK-3*. Der C-Terminus von *TREK-1* enthält keinen dem VLRfmt- (*TASK-1*) bzw. VLRflt-Motiv (*TASK-3*) ähnelnden Abschnitt. Außerdem erfolgt die Aktivierung von *TREK-1* erst durch Halothan in wesentlich höheren Konzentrationen. Die Zeitkonstante der resultierenden Aktivierung ist im Vergleich zu *TASK-1* und *TASK-3* größer, und die Grundaktivität wird um ein Vielfaches gesteigert. Die enorme Stromamplitude resultiert wohl nicht allein aus der Zunahme des über die 2PD-K⁺-Kanäle-vermittelten K⁺-Auswärtsstromes, sondern ist wenigstens teilweise auch bedingt durch eine Aktivierung anderer Ionenkanäle oder auch durch Induktion einer vermehrten Integration von *TREK-1*-Kanälen in die Oozytenmembran. Die fehlende Sättigung dieser Aktivierung, deutlich erkennbar in der graphischen Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung aller drei Kanäle aus der *TREK*-Familie (Abb. 3.3 B), spricht dafür, dass es sich um eine schwache

4 Diskussion

Bindungsform wie van-der-Waals-Kräfte oder Wasserstoffbrücken-Bindungen handelt.

Viele ligandenabhängige Ionen-Kanäle, darunter auch der für die Narkosewirkung wichtige Glutamat-Rezeptor, besitzen neben ihren Bindungsstellen für die jeweiligen Liganden auch Bindungstaschen im Bereich der Porendomäne, in die sich Inhalationsanästhetika einlagern können (Hashiguchi-Ikeda *et al.*, 2003). Eine der zahlreichen Arbeiten über die Frage der Struktur von Bindungsstellen für Anästhetika lieferte das theoretische Modell eines 4- α -Helixbündels, eine hydrophobe Tasche bildend, in der das Halothan-Molekül über schwache elektrostatische Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen oder van-der-Waals-Kräfte binden kann. Dieses Konstrukt imitiert vereinfacht die membranüberspannenden Segmente transmembranärer Proteine. Am Übergang von TM1 und C-Terminus besitzt *TREK-1* einen Abschnitt, der in seiner Abfolge hydrophiler und hydrophober Aminosäuren dem in dieser Arbeit verwendeten 4- α -Helixbündel-Modell einer hydrophoben Bindungstasche für Anästhetika vergleichbar ist. Nach Isomerisierung der einzelnen Untereinheiten ist eine Beteiligung dieses Bereiches an der Ausbildung einer solchen hydrophoben Bindungstasche für Halothan-Moleküle denkbar. In dem von Johansson erstellten Konstrukt ist die Anwesenheit hydrophiler Aminosäuren-Seitenketten wichtiger Bestandteil der hydrophoben Bindungstasche. Ihre Hydrierung bildet das für die Stabilisierung einer derartige Tasche erforderliche Milieu. Bereits der Austausch einer Aminosäure genügt, über minimale sterische, aber auch elektrostatische Veränderungen innerhalb dieser Bindungstasche die Affinität dieser Konstrukte gegenüber Halothan zu verändern (Johansson, 1998; Manderson *et al.*, 2002). Um eine solche Bindungstasche zu zerstören, wurden im entsprechenden Abschnitt mehrere Lysine, die sich durch eine positive Nettoladung auszeichnen, durch Valin ersetzt (Abb. 3.6 A), welches ungeladen und somit hydrophober ist und auch eine größere Seitenkette besitzt. Trotz dieser strukturellen Veränderungen kann *TREK-1*, [LLL310,302,304VVV] nach wie vor durch Halothan aktiviert werden. Jedoch bewirkt der Aminosäureaustausch eine deutliche Verminderung der Halothansensitivität. Mit dem Wildtyp vergleichbare Steigerungen des Auswärtsstromes können erst mit ca. 4-fach höheren Konzentrationen des Inhalationsanästhetikums erzielt werden. Eine Beteiligung dieser hier untersuchten Struktur zwischen Transmembransegment und C-Terminus an der Vermittlung der Halothan-vermittelten Aktivierung ist somit wahrscheinlich. Die Annahme einer hydrophoben Bindungstasche für

Inhalationsanästhetika als Korrelat der Wirkungsvermittlung bei den *TREK*-Kanälen ließe sich in diesem Sinne mit den Beobachtungen an *TREK-1*, [LLL310,302,304VVV] vereinbaren.

Auch die anderen an *TREK-1* durchgeführten Mutationen konzentrieren sich auf den Kanalabschnitt um TM4, allerdings ausgehend von einem anderen Modell der Interaktion von Inhalationsanästhetika mit Membranproteinen. Mit Hilfe von molekulardynamischen Simulationen in einem System aus synthetischen Lipid-Doppel-Membranen (DMPC) konnte mehrfach gezeigt werden, dass Halothan-Moleküle bevorzugt im Bereich der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht aggregieren (Johansson *et al.*, 1999; Koubi *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2002). Man geht davon aus, dass Rezeptor-Bindungsstellen für Anästhetika zu einem Teil auch durch Bestandteile der Lipidmembran gebildet werden (Eckenhoff M.F. *et al.*, 2002). Es konnte ferner eine spezifische Interaktion mit Tryptophan-Seitenketten sowohl am GramicidinA-Rezeptor wie auch an bovinem Serumalbumin nachgewiesen werden (Johansson *et al.*, 1995 und 1999; Manderson *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2002). Tatsächlich finden sich bei zahlreichen 2PD-K⁺-Kanälen im Bereich der Lipidmembran-Wasser-Grenzschichten, d.h. jeweils am Übergang intra- bzw. extrazellulärer und transmembranärer Proteinabschnitte, hochkonservierte Tryptophane (Abb. 4.1). Typischerweise übernehmen bei Membranproteinen Aminosäuren mit amphiphilen Seitenketten, wie z.B. Tryptophan, in diesen Bereichen die Funktion eines Proteinankers zur Stabilisierung des Proteins in der Membran, oder agieren als „Scharnier“ innerhalb eines Gates.

TREK-1	Y K P V V	W F W	I L V G L A Y F A A V L S M I	G D	W L R V I
TREK-2	Y K P L V	W F W	I L V G L A Y F A A V L S M I	G D	W L R V L
TAAK	Y Q P L V	W F W	I L L G L A Y F A S V L T T I	G N	W L R V V
TASK-1	Y F A F S F V Y	I L T G L T V I G A F L N L	V L R F M T M		
TASK-3	Y V A F S F M Y	I L V G L T V I G A F L N L	V L R F L T M		

Abb. 4.1: Ausschnitt aus der Primärsequenz einzelner 2PD-K⁺-Kanäle. Die Transmembrandomäne 4 der *TREK*-Kanäle wird flankiert von Tryptophanen (schwarz unterlegt). Ähnliche Motive finden sich im Bereich der anderen Transmembrandomänen hochkonserviert auch bei anderen 2PD-K⁺-Kanälen. Hervorgehoben ist außerdem das für die Halothanwirkung an den TASK-Kanälen essentielle 6-Aminosäurenmotiv.

Der Austausch dieser Aminosäuren bei *TREK-1* am extrazellulären Ende von TM4 (*TREK-1*, [WW290,293LL]) bzw. am Übergang zum C-Terminus (*TREK-1*, [W311L]) hat unterschiedliche Konsequenzen für die Halothansensitivität. Die maximale Aktivierung von *TREK-1*, [W311L] beträgt lediglich 109,3 % (zum Vergleich *TREK-1*,

4 Diskussion

[Wildtyp]: maximale Aktivierung um 2639,4 %) und erreicht innerhalb von Sekunden ihren Plateau-Wert. Der Austausch zweier Tryptophane am extrazellulär gelegenen Ende von TM4 bei *TREK-1*, [WW290,293LL] führt sogar dazu, dass dieser *TREK*-Kanal durch Halothan nicht mehr aktiviert, sondern deutlich inhibiert wird (Abb. 3.6 C).

Auch hier müssen ähnliche Überlegungen angestellt werden, wie bei der Diskussion der Mutagenese-Experimente an den *TASK*-Kanälen: Man kann dem am Beginn des C-Terminus von *TREK-1* positionierten Tryptophan nicht die entscheidende, alleinige Schlüsselrolle für die Vermittlung der Halothansensitivität zusprechen. Die durch die Wechselwirkung zwischen Halothan und dem Kanalprotein bewirkten Veränderungen der *TREK-1*-Aktivität lassen sich nicht ausschließlich an einem isolierten Proteinabschnitt bzw. an einer einzelnen Aminosäure festmachen. Wahrscheinlicher erscheint, auch unter Berücksichtigung der Aktivierungskinetik und der Dosis-Wirkungs-Beziehung, die Summation mehrerer Einzeleffekte, vermittelt über mehrere Interaktionsstellen. Die bei *TREK-1*, [WW290,293LL] beobachtete Wirkungsumkehr kann auf unterschiedliche Weise erklärt werden. Vorstellbar wäre zum einen, dass durch Zerstörung der für die Aktivierung verantwortlichen Interaktionsstelle eine andere, die Inhibition durch Halothan vermittelnde Struktur ihre Wirkung entfalten kann, die vorher durch die stark aktivierende Komponente überlagert worden war. Eine weitere mögliche Erklärung für diese Beobachtung findet sich unter Berücksichtigung der Proteindynamik. Die Halothanwirkung muss nicht unbedingt als unmittelbares Ergebnis struktureller, sterischer Veränderungen im Kanalprotein verstanden werden, sondern kann auch Folge von Veränderungen auf energetischer bzw. dynamischer Ebene sein. Schon seit einigen Jahren ist der direkte Zusammenhang zwischen der sog. Protein-Dynamik und der Funktion des Proteins bekannt. Nicht zuletzt die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor wird durch Flexibilität und Konformation des Rezeptorproteins wesentlich beeinflusst (Frauenfelder *et al.*, 1991). Für die Gruppe der Inhalationsanästhetika konnte bereits gezeigt werden, dass sie an Membranproteinen weniger zu strukturellen Veränderungen führen, sondern vielmehr die entropische Eigenschaften des Proteins beeinflussen (Johansson *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2002). Durch Integration des Agens im Bereich der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht kann bspw. die Verankerung des Proteins in der Membran gestört werden. Wie und in welchem Ausmaß die dynamischen Eigenschaften des Membranproteins dabei verändert werden und wie sich diese Veränderungen auf funktioneller Ebene niederschlagen,

hängt dabei weniger von der Stimulierung eines „Sensors“, d.h. einer mehr oder weniger spezifischen Bindungsstelle ab, sondern von der Suszeptibilität des Proteins für das Agens in seinem aktuellen Konformationszustand. Für alle Proteine existieren mehrere Konformationszustände. Abhängig von der jeweiligen Konformation des Kanalproteins könnte ein Molekül also über Interaktion an unterschiedlichen Abschnitten sowohl zu einer Aktivierung wie auch zu einer Inhibition führen – je nachdem, in welcher Richtung das Gleichgewicht der unterschiedlichen, koexistierenden Konformationszustände in Anwesenheit des Anästhetikums verschoben wird. Für *TREK-1*, [WW290,293LL] könnte das bedeuten, dass durch Aminosäurenaustausch an einer für die Stabilität des Kanalproteins entscheidenden Stelle die Konformation dieses 2PD-K⁺-Kanals derart verändert wurde, dass die Anwesenheit der Halothan-Moleküle nun zu einem gegensätzlichen Effekt führt.

Zwei grundsätzliche Schlussfolgerungen lassen sich zusätzlich aus diesen unterschiedlichen Ergebnissen ziehen: Das in zahlreichen Arbeiten immer wieder postulierte universelle Bindungsmotiv für die unterschiedlichen lipophilen Aktivatoren von *TREK-1*, wie Inhalationsanästhetika, Arachidonsäure, Lysophosphatidylcholin u.a. kann praktisch ausgeschlossen werden. Alle in dieser Arbeit untersuchten *TREK-1*-Mutanten konnten, unabhängig von den Veränderungen im Hinblick auf ihre Halothansensitivität, von Arachidonsäure in mit dem Wildtyp vergleichbarem Ausmaß aktiviert werden. Die beschriebenen qualitativen Veränderungen der makroskopischen Ströme der einzelnen *TREK-1*-Mutanten deuten außerdem darauf hin, dass Halothan an den mit *TREK-1*-cRNA injizierten *Xenopus*-Oozyten keine anderen hyperpolarisierenden Ströme aktiviert (s.o.). Eine additive Stromkomponente durch andere Ionenkanäle sollte konstant auch bei den Messungen mit den grundsätzlich halothansensitiven *TREK-1*-Mutanten beobachtet werden können. Die enormen Aktivierungen um bis das 20-fache des Ausgangswertes werden bei den *TREK-1*-Mutanten aber erst bei höheren Halothankonzentrationen oder überhaupt nicht erreicht.

4.2 Die 2PD-K⁺-Kanäle als Zielstruktur der Inhalationsanästhetika

4.2.1 Klinische Relevanz der 2PD-K⁺-Kanäle für die Narkose

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit können auch Rückschlüsse auf die tatsächliche Relevanz der 2PD-K⁺-Kanäle für die Anästhesie gezogen werden.

Eine Beteiligung dieser Kanäle an den im Rahmen einer Vollnarkose beobachteten physiologischen Veränderungen - die entscheidenden klinischen Endpunkte sind dabei Immobilität, Hypnose und Amnesie - und an den zahlreichen Nebenwirkungen dieser Substanzen setzt voraus, dass sich der beobachtete Effekt von Halothan auf die einzelnen 2PD-K⁺-Kanäle im Organismus auch neurophysiologisch manifestiert.

Es ist durchaus gerechtfertigt, aus den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnissen Schlussfolgerungen bezüglich ihrer Bedeutung für den Organismus zu ziehen. Besonders interessant sind dabei die durch Halothan und andere Inhalationsanästhetika aktivierbaren 2PD-K⁺-Kanäle *TASK-1* bzw. *TASK-3* und *TREK-1* bzw. *TREK-2*. Wie im Anhang unter 7.2 beschrieben, werden diese Kanäle sowohl prä- wie auch postsynaptisch in den Bereichen des ZNS exprimiert, die eben diese Funktionen regulieren. Mit Aktivierung von 2PD-K⁺-Kanälen an somatischen Motoneuronen, den Neuronen der Raphé-Kerne und der Körnerzellschicht des Kleinhirns können Sedation und Immobilisation erklärt werden, entsprechende Wirkung im *locus coeruleus* kann für Analgesie und hypnotischen Effekt von Bedeutung sein (Lesage, 2003). Inhalationsanästhetika nehmen außerdem über Inhibition von *TASK-1* und *TASK-3* Einfluss auf die Weiterleitung sämtlicher motorischer und sensorischer Informationen aus dem Thalamus zu kortikalen Neuronen und damit zum Bewusstsein (Meuth *et al.*, 2003). Die Wirkstärke eines Inhalationsanästhetikums wird durch den MAC-Wert ausgedrückt („*minimal alveolar concentration*“). Bei einer MAC von 1 bleibt die Reaktion auf einen Schmerzreiz oberhalb der Reizschwelle bei 50 % einer Population aus. Um eine ausreichende Wirkung zu gewährleisten genügt es, die jeweils angegebene MAC um 10-30 % zu steigern. Dem MAC-Wert von Halothan entspricht in wässriger Lösung bei Raumtemperatur eine Konzentration von 0,25 mM. Der klinisch relevante Konzentrationsbereich im Blut wird dabei in der Literatur mit 0,1 - 0,4 mM angegeben (Eger *et al.*, 2001; Franks N.P. *et al.*, 1994). Unter diesem Gesichtspunkt erscheinen besonders *TASK-1* und *TASK-3* interessant. Von allen 2PD-K⁺-Kanälen kommt die EC₅₀ von *TASK-1* und *TASK-3* diesem Bereich am nächsten.

Auch *THIK-1* wird durch Halothan in diesem Konzentrationsbereich beeinflusst. Eine Inhibition der K^+ -Leitfähigkeit durch Halothan, wie im Falle von *THIK-1*, kann bspw. an inhibierenden Interneuronen ebenfalls zu einer Verminderung neuronaler Erregbarkeit im Sinne einer Narkose beitragen.

Da bisher für keinen der bei einer Narkose beobachteten Effekte eine sichere Erklärung gefunden werden konnte, kann eine Beziehung zwischen der im *in vitro*-System bestimmten Sensitivität gegenüber einem Anästhetikum (in Form der EC_{50}) mit der Sensitivität einer bestimmten zentralnervösen Funktion (in Form der MAC, als Äquivalent der EC_{50}) nur unter Vorbehalt hergestellt werden. Die Anstiegssteilheit der für die 2PD- K^+ -Kanäle ermittelten Dosis-Wirkungs-Beziehungen, repräsentiert durch den Hill-Koeffizienten, ist deutlich niedriger als der für die MAC-Werte bei der Anästhetisierung einer Population. Während der Hill-Koeffizient für Aktivierung bzw. Inhibition der 2PD- K^+ -Kanäle durch Halothan in den vorliegenden Ergebnissen bei Messungen an den Wildtyp-Formen niemals 1,5 übersteigt, beträgt der entsprechende Wert für das *in vivo*-System um die 20 (Abb. 1.2). Man geht mittlerweile davon aus, dass mehrere unterschiedliche Targets an der Anästhetisierung beteiligt sind, die durch Addition der Einzeleffekte zu der beobachteten Wirkung - der Narkose - führen. Daraus resultiert natürlich auch eine Quantifizierung der pharmakodynamischen Parameter mit Zunahme der Anstiegssteilheit der Dosis-Wirkungs-Beziehung (Eckenhoff R.G. *et al.*, 1999). In Anbetracht einer solchen Addition muss die Relevanz der als „klinisch relevant“ bestimmten Konzentrationen für Untersuchungen an einem einzelnen Target kritisch bewertet werden. Die Einzeleffekte, die an der Narkose beteiligt sind, können für sich betrachtet eine Sensitivität in deutlich höheren, aber auch niedrigeren Konzentrationsbereichen besitzen. Die im Vergleich zu den anderen 2PD- K^+ -Kanälen geringere Sensitivität der Kanäle aus der *TREK*-Untergruppe, die ja erst durch Halothan in einer Konzentration weit außerhalb der sog. klinischen Relevanz aktiviert werden, schließt also eine Beteiligung dieser 2PD- K^+ -Kanäle an der Anästhesie nicht aus. Eingeschlossen ist hier auch *TRAAK*, der in der Literatur bisher als nicht halothansensitiv angeführt wurde (Franks N.P. *et al.*, 2004), da die üblicherweise verwendeten „klinisch relevanten Konzentrationen“ tatsächlich keinen signifikanten Effekt bewirken. Auch die EC_{50} der Inhibition von *TASK-1* durch Halothan liegt mit 4,17 mM deutlich über der EC_{50} der Aktivierung (0,45 mM) und damit auch außerhalb des klinisch relevanten Konzentrationsbereichs. Eine Manifestation dieser Wirkungsumkehr *in vivo* bei Einsatz höherer Konzentrationen

4 Diskussion

Halothan kann nicht ausgeschlossen werden. Letztlich ist es die Konzentration direkt am Wirkort, die die Wirkung des Anästhetikums bestimmt (Urban *et al.* 2002). Daher dürfen auch die 2PD-K⁺-Kanäle, die erst auf deutlich höhere Konzentrationen aktiviert werden, nicht als potenzielle Zielstruktur der Anästhetika ausgeschlossen werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten aus dem Oozyten-Expressionssystem werden untermauert durch zahlreichen Arbeiten mit der *patch-clamp*-Technik an verschiedenen Kulturzellen und am *slice*-Präparat von murinem ZNS-Gewebe. Aufgrund ihrer elektrophysiologischen und funktionellen Eigenschaften konnten die an somatischen Motoneuronen des Rattenhirns, an Neuronen des *locus coeruleus*, im Bereich thalamocorticaler Bahnen oder auch im Atemzentrum des Hirnstammes an der Ratte gemessenen Ströme einzelnen 2PD-K⁺-Kanäle zugeordnet werden (Bayliss *et al.*, 2001; Gruss *et al.* 2004; Lesage *et al.*, 2000b; Meadows *et al.*, 2001; Meuth *et al.*, 2003; Patel *et al.*, 1999, 2001; Shin *et al.*, 2003; Sirois *et al.* 2000; Talley *et al.*, 2000). Auch diese nativen Ströme unterliegen der Regulation durch Inhalationsanästhetika. Einen entscheidenden Beitrag zur Frage nach der Rolle der 2PD-K⁺-Kanäle bei der Narkose liefern auch Ergebnisse aus Arbeiten mit Gen-defizienten *knock-out* Mäusen. Bisher wurden *TREK-1*-, *TRAAK*- und *TASK-2*-defiziente *knock-out*-Mäuse untersucht (Franks, N.P. *et al.*, 2004; Gerstin *et al.*, 2003; Heurteaux *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu *TRAAK*-defizienten Tieren zeigen die Mäuse, denen der Kanal *TREK-1* fehlt, bei unverändertem Phänotyp sowohl gegenüber Chloroform wie auch gegenüber Halothan eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte Sensitivität.

4.2.2 Konsequenzen einer Beteiligung von 2PD-K⁺-Kanälen an der Narkosewirkung für die Klinik

Inwieweit ist es für die Klinik überhaupt erforderlich, die offensichtlich so komplexe Wirkungsweise der eingesetzten Anästhetika zu begreifen? Welcher Nutzen lässt sich aus derartigen Arbeiten ziehen?

Bei allen offenen Fragen bezüglich Wirkort und -mechanismus der verwendeten Narkotika liefern die zu diesem Thema vorliegenden unzähligen Arbeiten mit ihren unterschiedlichen Erklärungsversuchen und Annäherungsweisen durchaus sinnvolle Denkanstöße für die Klinik. Bei einer Beteiligung der 2PD-K⁺-Kanäle an der Narkose ließen sich nicht nur einige der beobachteten Nebenwirkungen erklären. Die

Kenntnis dieser Kanäle und das Wissen um ihre Bedeutung bei der Narkose eröffnen dem Kliniker zusätzlich wichtige Einflussmöglichkeiten. Drei dieser Einflussparameter wurden in der vorliegenden Arbeit exemplarisch an *TASK*-Kanälen dargestellt. In einem azidotischen Milieu, wie man es bspw. unter ischämischen Bedingungen erwarten würde, sind die pH-sensitiven *TASK*-Kanäle im Oozyten-Expressionssystem gegenüber dem Inhalationsanästhetikum praktisch insensitiv. Bei Anwendung von Inhalationsanästhetika im Zustand zerebraler Minderperfusion oder allgemeiner Hypoxämie ist daher von einer verminderten Ansprechbarkeit der 2PD-K⁺-Kanäle auf diese Substanzen auszugehen. *TASK-1* ist auch an der pH-abhängigen Regulation der Chemosensoren im Atemzentrum der Medulla oblongata beteiligt. Die durch eine pH-Absenkung verursachte Aktivitätsabnahme inhibitorischer Neurone dieser Hirnregion wird u.a. über *TASK*-Kanäle vermittelt (Bayliss *et al.*, 2001). So führt letztlich eine Abnahme des pH im Serum zu einer Stimulation des Atemzentrums. Eine Aktivierung dieser Neurone durch Halothan kann diesen Effekt einschränken. Bei verminderter Ansprechbarkeit der pH-abhängigen Chemosensoren besäße ein ansteigender pCO₂ nicht mehr den eigentlich zu erwartenden atemstimulierenden Effekt. Auch bei der durch Inhalationsanästhetika verursachten zentralen Atemdepression ist somit eine Beteiligung von 2PD-K⁺-Kanäle vorstellbar. Allerdings kommt es bei pH 6,9 im Extrazellulärraum neben einer Vielzahl anderer neurologischer Veränderungen ohnehin zu einer Bewusstseinsminderung im Sinne einer Narkose bei MAC (Eisele *et al.*, 1967). Im Tierversuch wurde eine Verminderung der MAC, d.h. gesteigerte Potenz der Inhalationsanästhetika unter hypoxischen und azidotischen Bedingungen gemessen (Eger, 2002). Die verminderte Halothansensitivität der *TASK*-Kanäle unter azidotischen Bedingungen *in vitro* wird im *in vivo*-System nicht manifest.

Auch die intrazelluläre Ca⁺⁺-Konzentration beeinflusst Grundaktivität und Aktivierung von *TASK-1* durch Halothan. BAPTA-AM, ein intrazellulärer Ca⁺⁺-Chelator, bindet intrazelluläres Ca⁺⁺ und führt dazu, dass die Grundaktivität von *TASK-1* vermindert wird. In diesem Zustand ist auch die Aktivierbarkeit durch Halothan eingeschränkt. Inhalationsanästhetika greifen selbst aktiv auf unterschiedlichen Wegen in die neuronale Ca⁺⁺-Homöostase ein. An Neuronen des Hinterstrangganglions der Maus, aber auch am *slice*-Präparat des Rattenhirns konnte nachgewiesen werden, dass Halothan über Depletion intrazellulärer Speicher zu einer Zunahme der intrazellulären Ca⁺⁺-Konzentration führt (Gomes *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2002). Darüberhinaus wird über eine Blockade spannungsabhängiger Ca⁺⁺-Kanäle der

4 Diskussion

Einstrom aus dem Extrazellulärraum vermindert und so die Neurotransmitterausschüttung gehemmt (Mashour *et al.*, 2005). Diese Arbeit beschreibt nun eine verminderte Grundaktivität und eine reduzierte Ansprechbarkeit der 2PD-K⁺-Kanäle auf Halothan bei niedrigem intrazellulärem Kalziumspiegel. Eine Inhibition von 2PD-K⁺-Kanälen nach Absenkung der intrazellulären Ca⁺⁺-Konzentration führt zur Depolarisation der erregbaren Membranen. Tatsächlich führen intrazelluläre Ca⁺⁺-Chelatoren zu gesteigerter neuronaler Erregbarkeit (Hille, 1992). Störungen der neuronalen Ca⁺⁺-Homöostase werden mit unterschiedlichen neuropathologischen Zuständen ursächlich oder konsekutiv in Verbindung gebracht: Mit ischämischen und hypoglykämischen Entgleisungen, Epilepsie und neurodegenerativen Krankheiten wie der Alzheimer-Erkrankung (Hernández-Fonseca *et al.*, 2005). Eine verminderte Aktivität von 2PD-K⁺-Kanälen unter diesen Bedingungen ist in vieler Hinsicht auch für die Klinik interessant. Es stellt sich die Frage, inwieweit der neuronale oder periphere Ca⁺⁺-Haushalt bei Anwendung von Inhalationsanästhetika berücksichtigt werden muss.

Als letztes soll hier auf die Modulation der 2PD-K⁺-Kanäle durch Neurotransmitter eingegangen werden. Neurotransmitter entfalten ihre Wirkung in unterschiedlichsten Bereichen des zentralen und peripheren Nervensystems über die Inhibition von K⁺-Leckleitfähigkeiten, die z.T. auch einzelnen 2PD-K⁺-Kanäle zugeordnet werden können: In Kortex und Thalamus, im Hippocampus, im Hypothalamus, im enterischen Nervenplexus des Ileum, in aminergen Hirnstamm-Neuronen, in der Körnerzellschicht des Kleinhirns, aber auch in Motoneuronen (Talley *et al.*, 2003). Ein Einfluss der 2PD-K⁺-Kanäle auf sämtliche durch diese Neurohormone kontrollierten Funktionen ist dabei vorstellbar. Auch der Neurotransmitter-vermittelte erregende Effekt auf somatische Motoneuronen wird zu einem beträchtlichen Teil über eine Inhibition von *TASK-1*-Kanälen bewirkt (Bayliss *et al.*, 2001). Eine Aktivierung dieser Targets, bspw. durch Inhalationsanästhetika, könnte diesen aktivierenden Effekt abschwächen oder sogar aufheben. Nicht zuletzt die Immobilisation durch Inhalationsanästhetika könnte mit einem solchen Eingriff in das neurohumorale System erklärt werden. Die in dieser Arbeit speziell untersuchten 5-HT_{2C}-Rezeptoren finden sich in hoher Konzentration im *plexus choreoideus*, im limbischen System, in der *substantia nigra* und im *globus pallidum*. Im Bereich des ZNS hat Serotonin Einfluss auf Appetit, Lernvorgänge und zahlreiche andere kognitive und vegetative Funktionen. In elektrophysiologischen Untersuchungen zeigte sich außerdem, dass die Aktivität des serotonergen Systems direkt mit dem

Erregungszustandes eines Individuums korreliert (Rueter *et al.*, 1997). Verschiedene psychiatrische und neurologische Erkrankungen wie Depressionen, Migräne, Zwangsstörungen u.a. werden mit Veränderungen des zentralen Serotoninspiegels in Verbindung gebracht. Die bei diesen Krankheitsbildern eingesetzten Wirkstoffe greifen aktivierend oder inhibierend in den Serotonin-Stoffwechsel ein. In Abschnitt 3.3.2 konnte beispielhaft anhand von an 5-HT_{2C}-Rezeptoren gekoppeltem *TASK-3* gezeigt werden, dass es bereits bei Anwesenheit einer für physiologische Verhältnisse geringen Menge Neurotransmitter (5-HT) zu einer signifikanten Inhibition von *TASK-3* kommt, und Halothan die so inhibierten *TASK-3* Ströme nicht mehr aktivieren kann. Eine Veränderung im Serotonin-Stoffwechsel, als Folge einer Erkrankung oder auch medikamentös verursacht, kann das Ansprechen eines Individuums auf Inhalationsanästhetika beeinflussen. Aber auch der allgemeine Aktivierungsgrad dieses Individuums wäre für die Wirkungsentfaltung eines Anästhetikums, das an den 2PD-K⁺-Kanälen angreift, von Bedeutung. In gesteigertem Aktivierungszustand und damit verbundenem erhöhtem Serotoninspiegel wäre die Sensitivität dieser Targets reduziert. Es überrascht nicht, dass stark agitierte Patienten höhere Anästhetika-Dosen benötigen. Mit den 2PD-K⁺-Kanälen als Wirkungsvermittler ließe sich diese Beobachtung auch physiologisch begründen. Tatsächlich gibt es klinische Anhaltspunkte für eine Interaktion von Anästhetika mit dem serotonergen System. Aus Untersuchungen an Ratten weiß man, dass die Gabe von Serotonin-Antagonisten über unbekannte Interaktionen zu einer Wirkungsverstärkung verschiedener Anästhetika führt (Dringenberg, 2000).

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Interaktion des Inhalationsanästhetikums Halothan mit den 2PD-K⁺-Kanälen. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, unterscheiden sich die einzelnen Kanäle bezüglich der Amplitude von Aktivierung oder Inhibition, aber auch hinsichtlich der Sensitivität.

- *TASK-1* und *TASK-3* werden durch Halothan in einer EC₅₀ von 0,45 mM bzw. 0,6 mM aktiviert.
- Die 2PD-K⁺-Kanäle der *TREK*-Familie (*TREK-1*, *TREK-2* und *TRAAK*) werden durch Halothan in Konzentrationsbereichen über 9,5 mM aktiviert. Die Zeitkonstanten der Aktivierung betragen dabei mehrere Minuten. Aktivitätszunahmen um bis das 25- fache können dargestellt werden.
- *THIK-1* wird durch Halothan in einer EC₅₀ von 2,29 mM inhibiert.

Zusätzlich konnte mit Hilfe sog. *site-directed-mutagenesis* Experimente gezeigt werden, dass die bisher in der Literatur oft geäußerte Idee einer unspezifischen, universellen Bindungsstelle für unterschiedliche Liganden im Bereich des C-Terminus verworfen werden muss.

- Wahrscheinlicher ist, dass der entsprechende Abschnitt bei den Kanälen der *TASK*- bzw. der *TREK*-Familie Bestandteil eines noch genauer zu klärenden Gate-Mechanismus ist. Wahrscheinlich führt die Wechselwirkung von Halothan mit definierten Abschnitten dieser Kanalproteine über eine Konformationsänderung auf Ebene der Proteindynamik zu den beobachteten Aktivitätsänderungen.
- Vermutlich existieren an jedem Kanal mehrere solcher Interaktionsstellen für Inhalationsanästhetika, die als Sensor am Beginn dieser Veränderungen stehen. Sie liegen bei den *TASK*- und bei den *TREK*-Kanälen in umschriebenen Abschnitten im Bereich der zweiten Poren-Domäne an der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht.
- Die Unterschiede, die sich bei der Regulation der einzelnen 2PD-K⁺-Kanäle auch innerhalb der gleichen Subgruppe finden, zeigen, wie eng Struktur und Funktion

dieser Kanäle miteinander verbunden sind. Von einem universellen Wirkprinzip der Inhalationsanästhetika kann man hier nicht ausgehen.

Die K^+ -Hintergrundleitfähigkeit, vermittelt über die 2PD- K^+ -Kanäle, ist ein entscheidender Regulator zellulärer Erregbarkeit. Als Targets der Inhalationsanästhetika wird diesen Kanälen eine wichtige Rolle bei der Wirkungsvermittlung einer Narkose zugesprochen. Messungen an Hirnpräparaten sowie Versuche mit Gen-defizienten Mäusen stützen diese Annahme.

- Die 2PD- K^+ -Kanäle werden u.a. in den Kompartimenten des ZNS exprimiert, die durch Anästhetika in ihrem Aktivitätszustand verändert werden. Sowohl Zu- wie auch Abnahme der K^+ -Hintergrundleitfähigkeiten und die damit verbundene Hyper- bzw. Depolarisation aktivierender Neuronenverbände bzw. inhibitorisch wirkender Neurone in diesen Bereichen ist als Korrelat der Anästhetikawirkung denkbar.
- Die in dieser Arbeit erstellten Dosis-Wirkungs-Beziehungen zeigen die Aktivierung der *TASK*-Kanäle nahe am Bereich klinisch relevanter Konzentrationen.
- Für die *TREK*-Kanäle und *THIK-1*, deren Sensitivität außerhalb dieses relevanten Konzentrationsbereiches liegt, kann eine Beteiligung am Wirkmechanismus der Inhalationsanästhetika nicht ausgeschlossen werden. Der als klinisch relevant beschriebene Konzentrationsbereich erlaubt keine Rückschlüsse auf die am Wirkort erforderliche Wirkstoffkonzentration.
- Zusätzlich zeigen die hier durchgeführten Messungen im *Xenopus*-Oozyten-Expressionssystem, welche Einflussmöglichkeiten sich mit diesen Erkenntnissen eröffnen. Die durch die 2PD- K^+ -Kanäle vermittelte K^+ -Hintergrundleitfähigkeit unterliegt einer Vielzahl von Regulationsfaktoren, die ihrerseits auch mit den an diesen Targets angreifenden Anästhetika interagieren. Eine derartige Interaktion konnte für pH-Wert, Ca^{++} -Homöostase und Kopplung an Serotonin-Rezeptoren beispielhaft gezeigt werden. Die Aktivierung von *TASK* durch Halothan wird durch die genannten Regulatoren empfindlich gestört.
- Ein Einfluss dieser Parameter auf Wirkung und Nebenwirkung eines Inhalationsanästhetikums ist sehr wahrscheinlich und sollte bei klinischen und experimentellen Fragestellungen berücksichtigt werden.

6 Literaturverzeichnis

Ahern, A.A., Horn, R. (2004) Stirring up controversy with a voltage sensor paddle. *Trends in Neuroscience* **27** (6): 303-307.

American Board of Anesthesiology. *Booklet of information.* Raleigh, ABA 1998.

Axon Instruments, Inc. (2001) The Axon guide for electrophysiology & biophysics laboratory techniques.

Bang, H., Kim, Y., Kim, D. (2000) *TREK-2*, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K⁺ channel family. *J. Biol. Chem.* **275** (23): 17412-17419.

Bayliss, D.A., Talley, E.M., Sirois, J.E., Lei, Q. (2001) *TASK-1* is a highly modulated pH-sensitive 'leak' K⁺ channel expressed in brainstem respiratory neurons. *Respir. Physiol.* **129**: 159-174.

Bockenhauer, D., Zilberberg, N., Goldstein, S.A. (2001) KCNK2: reversible conversion of a hippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel. *Nature Neurosci.* **4**: 486-491.

Buckingham S.D, Kidd J.F., Law R.J., Franks C.J., Sattelle D.B. (2005) Structure and function of two-pore-domain KC channels: contributions from genetic model organisms. *Trends in Pharmacological Sciences* **26** (7): 361-367.

Callahan, R., Labunskiy, D.A., Logvinova, A., Abdallah, M., Liu, C., Cotten, J.F., Yost, C.S. (2004) Immunolocalization of *TASK-3* (KCNK9) to a subset of cortical neurons in the rat CNS. *BBRC* **319**: 525-530.

Cantor, R. (2001) Breaking the Meyer-Overton rule: Predicted effects of varying stiffness on interfacial activity on the intrinsic potency of anesthetics. *Biophys. J.* **80** (5): 2284-2297.

Chavez, R.A., Gray, A.T., Zhao, B.B., Kindler, C.H., Mazurek, M.J., Meta, Y., Forsayeth, J.R., Yost, C.S. (1999) *TWIK-2*, a new weak inward rectifying member of the tandem pore domain potassium channel family. *J. Biol. Chem.* **274** (12): 7887-7892.

- Chemin, J., Girard, C., Duprat, F., Lesage, F., Romey, G., Lazdunski, M.** (2003) Mechanisms underlying glutamate receptors via inhibition of 2P domain K⁺ channels. *EMBO J.* **22** (20): 5403-5411.
- Chopp, M., Frinak, S., Walton, D.R., Smith, M.B., Welch, K.M.** (1987) Intracellular acidosis during and after cerebral ischemia: in vivo nuclear magnetic resonance study of hyperglycemia in cats. *Stroke* **18**:919-923.
- Cziriák, G., Enyedi, P.** (2002) Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore-domain potassium channel subunits. *J. Biol. Chem.* **277** (7): 5426-5432.
- Dilger J.P.** (2002) The effects of general anesthetics on ligand-gated ion channels. *Br. J. Anaesth.* **89** (1): 41-51.
- Doyle, D.A.** (2004) Structural changes during ion channel gating. *Trends in Neuroscience* **27** (6): 298-302
- Doyle, D.A., Cabral J.M., Pfuetzner R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R.** (1998) The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**: 69-77.
- Dringenberg, H.C.** (2000) Serotonergic receptor antagonists alter responses to general anesthetics in rats. *Br. J. Anaesth.* **85** (6): 904-906.
- Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., Lazdunski, M.** (1997) TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.* **16**: 5464-5471.
- Eckenhoff, M.F., Chan, K., Eckenhoff, R.G.** (2002) Multiple specific binding targets for inhaled anesthetics in the mammalian brain. *JPET* **300**: 172-179.
- Eckenhoff, M.F., Eckenhoff, R.G.** (1998) Quantitative autoradiographie of halothane binding in rat brain. *J Pharmacol Exp Therap* **285**: 371–376.
- Eckenhoff, R.G., Johansson, J.S.** (1997) Molecular interactions between inhaled anesthetics and proteins. *Pharmacol. Reviews* **49** (4): 343-367.
- Eckenhoff, R.G., Johansson, J.S.** (1999) On the relevance of „clinically relevant concentrations“ of inhaled anesthetics in *in vitro* experiments. *Anesthesiology* **91**: 856-860.

- Eckenhoff, R.G.** (2001) Promiscuous ligands and attractive cavities: How do the inhaled anesthetics work? *Mol. Interv.* **1** (5): 259-268.
- Eger, E.I.** (2002) A brief history of the origin of minimum alveolar concentration (MAC). *Anesthesiology* **96** (1):238-239.
- Eger, E.I., Fisher, D.M., Dilger, J.P., Sonner, J.M., Evers, A., Franks, N.P., Harris, R.A., Kendig, J.J., Lieb, W.R., Yamakura, .T** (2001) Relevant concentrations of inhaled anesthetics for *in vitro* studies of anesthetic mechanisms. *Anesthesiology* **94**: 915-921.
- Eisele, J.H., Eger, E.I., Muallem, M.** (1967) Narcotic properties of carbon dioxide in the dog. *Anesthesiology* **28**: 856-865.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K.** (Hrsg.) (1996) Pharmakologie und Toxikologie (6. Auflage), *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Franks, J.J., Wamil, A.W., Janicki, P.K., Horn, J.L., Franks, W.T., Janson, V.E.** (1998) Anesthetic-induced alteration of Ca⁺⁺ homeostasis in neural cells: temperature-sensitive process that is enhanced by blockade of plasma membrane Ca⁺⁺-ATPase isoforms. *Anesthesiology* **89**: 149-164.
- Franks, N.P., Lieb, W.R.** (1994) Molecular and cellular mechanism of general anaesthesia. *Nature* **367**: 607-614.
- Franks, N.P., Honoré, E.** (2004) The *TREK* K_{2P} channels and their role in general anesthesia and neuroprotection. *Trends in Pharmacological Sciences* **25**(11): 601-608.
- Franks, N.P., Lieb, W.R.** (1988) Inhalational anesthetics activate a novel neuronal K⁺ current. *Nature* **333**: 662-664.
- Frauenfelder H., Sligar, S.G., Wolynes, P.G.** (1991) The energy landscapes and motions of proteins. *Science* **254**: 1598-1603.
- Gerstin, K.M., Gong, D.H., Abdallah, M., Winegar, B.D, Eger, E.I. II, Gray, A.T.** (2003) Mutation of KCNK5 or Kir3.2 potassium channels in mice does not change minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth. Analg.* **96**: 1354-1359.

- Goldstein, S.A.N., Bayliss, D.A., Kim, D., Lesage, F., Plant, L.D., Rajan, S.** (2005) International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**: 527-540.
- Goldstein S.A.N., Bockenhauer, D., O'Kelly, I., Zilberberg, N.** (2001) Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Neuroscience* **2**: 175-183.
- Goldstein, S.A.N., Price, L.A., Rosenthal, D.N., Pausch, M.** (1996) ORK1, a potassium selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 13256-13261.
- Gomes, D.A., Guatimosim, C., Renato, S.G., Leite, M.F., Vieira, L.B., Prado, M.A., Romano-Silvo, M.A., Gomez, M.V.** (2004) Effect of halothane on the release of $[Ca^{2+}]_i$ in dorsal root ganglion neurons. *Neuroreport* **15** (7): 1187-1190.
- Gomez, R.S., Guatimosim, C.** (2002) Mechanism of action of volatile anesthetics: involvement of intracellular calcium signaling. *Curr. Drug. Targets* **2**: 53-59.
- Gruss, M., Bushell, T.J., Bright, D.P., Lieb, W.R., Mathie, A., Franks, N.P.** (2004) Two-pore-domain K^+ channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane. *Mol. Pharmacol.* **65**: 443-452.
- Gutman, G.A. et al.** (2003) International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: Potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **55**: 583-586.
- Hashiguchi-Ikeda, M., Namba, T., Ishii, T.M., Hisano, T., Fukuda, K.** (2003) Halothane inhibits an intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel by acting at the extracellular side of ionic pores. *Anesthesiology* **99** (6): 1340-1345.
- Hernández-Fonseca, K., Massieu, L.** (2005) Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis Inhibition in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosc. Res.* **82** (2): 196-205.

- Heurteaux, C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski L., Widmann, C., Zanzouri, M., Romey, G., Lazdunski, M.** (2004) *TREK-1*, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J.* **23**:2684-2695.
- Hervieu, G.J., Cluderay, J.E., Gray, C.W., Green, P.J., Ranson, J.L., Randall, A.D., Meadows, H.J.** (2001) Distribution and Expression of *TREK-1*, a two-pore domain potassium channel, in the adult rat CNS. *Neuroscience* **103** (4): 899-919.
- Hille, B.** (1992) Ionic channels of excitable membranes (second edition). *Sinauer Associates Inc.*, Sunderland, Massachusetts.
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., Katz, B.** (1952) Measurement of current voltage relations in the membrane of the giant axon of *Ioligo*. *J. Physiol* **116**: 424–448:
- Johansson, J.S., Eckenhoff, R.G., Dutton, P.L.** (1995) Binding of halothane to serum albumin demonstrated using tryptophan fluorescence. *Anesthesiology* **83** (2):316-324.
- Johansson, J.S., Zou, H., Tanner, J.W.** (1999) Bound volatile general anesthetics alter both local protein dynamics and global protein stability. *Anesthesiology* **90**: 235-245.
- Johansson, J.S.** (1998) Probing the structural features of volatile anesthetic binding sites with synthetic peptides. *Toxicol. Letters* **100-101**: 369-375.
- Karschin, A.** (2001) K⁺ Kanäle mit zwei Porendomänen: funktionelle Bedeutung einer neuen Proteinfamilie im Nervensystem. *Neuroforum* **3**: 82-92.
- Karschin, C., Wischmeyer, E., Preisig-Müller, R., Sindhu, R., Derst, C., Grzeschik, K.-H., Daut, J., Karschin, A.** (2001) Expression pattern in brain of *TASK-1*, *TASK-3*, and a tandem pore domain K⁺ channel subunit, *TASK-5*, associated with the central auditory nervous system. *MCN* **18**: 632-648.
- Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., Goldstein, S.A.N.** (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**: 690-695.

- Kim, Y, Bang, H., Kim, D.** (2000) *TASK-3*, a new member of the tandem pore K⁺ channel family. *J. Biol. Chem.* **275** (13): 9340-9347.
- Kindler, C.H., Pietruck, C., Yost, C.S., Sapson, E.R., Gray, A.T.** (2000) Localization of the tandem pore domain K⁺ channel *TASK-1* in the rat central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **80**: 99-108.
- Koubi, L., Tarek, M., Bandyopadhyay, S., Klein, M.L., Scharf, D.** (2001) Membrane structural perturbations caused by anesthetics and nonimmobilizers: A molecular dynamics investigation. *Biophys. J.* **81**: 3339-3345.
- Koubi, L., Tarek, M., Klein, L.M., Scharf, D.** (2000) Distribution of halothane in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer from molecular dynamics calculations. *Biophys J.* **78**: 800–811.
- Kretz, F.-J., Schäffer, J.** (2000), *Anästhesie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie* (3. Auflage), *Springer*, Berlin, Heidelberg, New York.
- Kuo, A., Gulbis, J. M., Antcliff, J. F., Rahman, T., Lowe, E. D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F. M., Ezaki, T., and Doyle, D. A.** (2003) Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state, *Science* **300**: 1922-1926.
- Lesage, F., Reyes, R., Fink, M., Heurteaux, C., Lazdunski, M.** (1996a) Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfid bridge. *EMBO J.* **15**: 6400-6407.
- Lesage, F., Terrenoire, C., Romey, G., Lazdunski, M.** (2000a) Human *TREK-2*, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and G_s, G_i, and G_q protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **275**: 28398-28405.
- Lesage F., Lazdunski, M.** (2000b) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **279**: 793-801.
- Lesage, F.** (2003) Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharm.* **44**: 1-7.
- Lesage, F. et al.** (1996b) TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J.* **15**: 1004-1011.

- Liu, C., Au, J.D., Liao Zou, H., Coten, J.F., Yost, C.S.** (2004) Potent activation of the human tandem pore domain K^+ channel *TRESK* with clinical concentrations of volatile anesthetics. *Anesth. Analg.* **99**: 1715-1722.
- Manderson, G.A, Johansson, J.S.** (2002) Role of aromatic side chains in the binding of volatile general anesthetics to a four-alpha-helix bundle. *Biochemistry* **41** (12): 4080-4087.
- Mashour, G.A., Stuart, A.F., Campagna, J.A.** (2005) Mechanisms of general anesthesia: From molecules to mind. *Best Pract. Res. Clin. Anaesth.* **19** (3): 349-364.
- Meadows, H.J., Randall, A.D.** (2001) Functional characterisation of human *TASK-3*, an acid-sensitive two-pore domain potassium channel. *Neuropharmacology* **40**: 551-559.
- Medhurst A.D., Rennie, G., Chapman, C.G., Meadows, H., Diuckworth, M.D., Kelsell, R.E., Gloger, I.I., Pangalos, M.N.** (2001) Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Mol. Brain Res.* **86**: 101-114.
- Meuth, S.G., Budde, T., Kanyshkova, T., Broicher, T., Munsch, T., Pape, H.C.** (2003) Contribution of TWIK-related acid-sensitive K^+ channel 1 (*TASK-1*) and *TASK-3* channels to the control of activity modes in thalamocortical neurons. *J. Neurosci.* **23** (16): 6460-6469.
- Millar J.L., Barratt L., Andrew P. Southan A.P., Page K.M., Fyffe R.E.W, Robertson B, Mathie A.** (2000) A functional role for the two-pore domain potassium channel *TASK-1* in cerebellar granule neurons. *PNAS* **97** (7): 3614–3618.
- Miller, K.W.** (2002) The nature of sites of general anaesthetic action. *Br. J. Anaesth.* **89** (1): 17-31.
- Nicoll, R.A., Madison, D.V.** (1982) General Anesthetics hyperpolarize neurons in the vertebrate central nervous system. *Science* **217**: 1055-1057.
- O'Connell, A.D., Morton, M.J., Hunter, M.** (2002) Two-pore domain K^+ channels – molecular sensors *Biochim. Biophys. Acta* **1566**: 152-161.

- Patel, A.J., Honoré, E., Lesage, F., Fink, M., Romey, G., Lazdunski, M.** (1999) Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat. Neurosci.* **2** (5): 422-426.
- Patel, A.J., Honoré, E.** (2001) Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends in Neuroscience* **24** (6): 339-346.
- QUIAGEN** Plasmid Midi and Maxi Protocol. *Plasmid Purification Handbook* 7/99.
- Rajan, S., Preisig-Müller, R., Wischmeyer, E., Nehring, R., Hanlexy, P.J., Renigunta, V., Musset, B., Schlichthorl, G., Derst, C., Karschin, A., Daut, J.** (2002) Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels *TASK-1* and *TASK-3*. *J. Physiol.* **545** (1): 13-26.
- Rajan, S., Wischmeyer, E., Liu, G.X., Preisig-Müller, R., Daut, J., Karschin, A., Derst, C.** (2000) *TASK-3*, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* **275** (22): 16650-16657.
- Rajan, S., Wischmeyer, E., Karschin, C., Preisig-Müller, R., Grzeschik, K-H., Daut, J., Karschin, A., Derst, C.** (2001) *THIK-1* and *THIK-2*, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **276** (10): 7302-7311.
- Reyes, R., Lauritzen, I., Lesage, F., Ettaiche, M., Fosset, M., Lazdunski, M.** (2000) Immunolocalization of the arachidonic acid and mechanosensitive baseline *TRAAK* potassium channel in the nervous system. *Neurosci.* **95** (3): 893-901.
- Ries, C.R., Puil, E.** (1999) Ionic mechanisms of isoflurane's actions on thalamocortical neurons. *J. Neurophysiol.* **81**: 1802-1809.
- Rudolph, U, Antkowiak, B.** (2004) Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**(9): 709-725.
- Rueter, L.E., Fornal, C.A., Jacobs, L.B.** (1997) A critical review of 5-HT brain microdialysis and behaviour. *Rev. Neurosci.* **8**: 117-137.
- Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Kitada, C., Yokoi, H., Nozawa, K., Okada, H., Matsushime, H., Furuichi, K.** (2003) A novel two-pore domain K⁺ channel, *TRESK*, is localized in the spinal cord. *J. Biol. Chem.* **278** (30): 27406-27412.

- Shin, W.-J., Winegar, B.D.** (2003) Modulation of noninactivating K⁺ channels in rat cerebellar granule neurons by halothane, isoflurane, and sevoflurane. *Anesth. Analg.* **96**: 1340-1344.
- Sirois, J.E., Pancrazio, J.J., Lynch, C., Bayliss, D.A.** (1998) Multiple ionic mechanisms mediate inhibition of rat motoneurons by inhalational anaesthetics. *J. Physiol.* **512** (3): 851-862.
- Sirois, J.E., Lei, Q., Talley, E.M., Lynch, C., Bayliss, D.A.** (2000) The *TASK-1* two-pore domain K⁺ channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalational anesthetics. *J. Neurosci.* **20** (17): 6347-6354.
- Talley, E.M., Solòrzano, G., Lei, Q., Kim, D., Bayliss, D.A.** (2001) CNS distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *The Journal of Neuroscience* **21** (19): 7491-7505.
- Talley, E.M., Bayliss, D.A.** (2002) Modulation of *TASK-1* (Kcnk3) and *TASK-3* (Kcnk9) potassium channels: Volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action. *J. Biol. Chem.* **277** (20): 17733-17742.
- Talley, E.M., Lei, Q., Sirois, J.E., Bayliss, D.A.** (2000) *TASK-1*, a two-pore domain K⁺ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron* **25**: 399-410.
- Talley, E.M., Sirois, J.E., Lei, Q., Bayliss, D.A.** (2003) Two-pore-domain (KCNK) potassium channels: Dynamic roles in neuronal function. *The Neuroscientist* **9** (1):46-56.
- Tang, P., Xu, Y.** (2002) Large-scale molecular dynamics simulations of general anesthetic effects on the ion channel in the fully hydrated membrane: the implication of molecular mechanisms of general anesthesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (25): 16035-16040.
- Urban, B.W., Bleckwenn, M.** (2002) Concepts and correlations relevant to general anaesthesia. *Br. J. Anaesth.* **89** (1): 3-16.
- Winegar, B.D., Owen D.F., Yost, C.S.** (1996) Volatile general anesthetics produce hyperpolarization of *Aplysia* neurons by activation of a discrete population of baseline potassium channels. *Anesthesiology* **85**: 889-900.

7 Anhang

7.1 Charakteristische Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten 2PD-K⁺-Kanäle

TASK (“TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel”): **TASK-1, TASK-3, TASK-5**

Diesen drei Kanälen ist eine hohe Sensitivität gegenüber pH-Wert-Änderungen im physiologischen Bereich gemeinsam. Sie werden bei einer Absenkung des extrazellulären pH-Wertes inaktiviert und durch Alkalisierung aktiviert, unterscheiden sich jedoch bezüglich ihres pK-Wertes. Im Übrigen ähneln sich *TASK-1* und *TASK-3* elektrophysiologisch stark. Sowohl *TASK-1* wie auch *TASK-3* können via Gq/11-gekoppelte Rezeptoren inhibiert werden, und unterliegen so auch der Regulation durch verschiedene Neurotransmitter wie bspw. Thyrosin-Releasing-Hormon (TRH), Serotonin (5-HT), Glutamat, Substanz P und Norepinephrin. (Bayliss et al., 2001; Duprat et al., 1997; Kim et al., 2000; Rajan et al., 2000; Talley et al., 2000, 2002). Für den Einbau in die Membran sind die Proteine 14-3-3 (*TASK-1* und *TASK-3*) und p11 (*TASK-1*) essentiell (Goldstein et al., 2005; Rajan et al., 2002). Heterodimerisation von *TASK-1* und *TASK-3* im heterologen Expressionssystem, aber auch im Nativgewebe wurden beschrieben (Czirják et al., 2002, Goldstein et al., 2005). *TASK-3* wurde ferner in verschiedenen Karzinom-Formen nachgewiesen. Seine Bedeutung für die Onkogenese ist aber noch unklar (Goldstein *et al.*, 2005)

THIK (“Tandem Pore Domain Halothane-inhibited K⁺ channel”): **THIK-1, THIK-2**

Ihren Namen verdanken die Kanäle dieser Untergruppe der Tatsache, dass sie durch das Inhalationsanästhetikum Halothan inaktiviert werden. *THIK-2* konnte im heterologen System bisher nicht exprimiert werden. *THIK-1* wird durch extrazelluläre Ansäuerung nur schwach inhibiert, durch Arachidonsäure vergleichbar stark wie andere 2PD-K⁺-Kanäle aktiviert. (Rajan et al., 2000). Im Nativgewebe zeigt sich, dass *THIK-1* durch Absenken des pO₂ inhibiert wird. Er könnte somit eine wichtige Rolle bei der Chemozeption glossopharyngealer Neuronen oder auch für die durch zerebrale Ischämie ausgelösten (patho)physiologischen Veränderungen der Neuronenaktivität einnehmen (Campanucci, 2005).

TREK ("TWIK-related K⁺ channel"): TREK-1, TREK-2, TRAAK

Neben *TREK-1* und *TREK-2* gehört auch *TRAAK* ("*TWIK-related arachidonic acid-stimulated K⁺-channel*") als genetisches und funktionelles Homolog zu dieser Untergruppe. Die *TREK*-Kanäle werden durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren, Arachidonsäure oder Lysphosphatidylcholin aktiviert. Gesättigte Fettsäuren haben dagegen keinen Einfluss auf die Kanalaktivität. (Bang et al., 2000; Fink et al., 1996; Lesage et al., 2000a, Maingret et al., 1999; Patel et al., 2001; Rajan et al., 2000). Das neuroprotektiv wirksame Riluzol ist ein potenter Aktivator von *TRAAK* (Goldstein et al., 2005). Diese Kanäle besitzen außerdem die innerhalb der Familie der 2PD-K⁺-Kanäle einzigartige Eigenschaft, durch Veränderungen des Membrandrucks reguliert werden zu können. Erhöht man den über die Lipidmembran auf den Kanal wirkenden Druck über Membranstress, Zellvolumenzunahme oder negativen Druck bspw. über eine Patch-clamp-Elektrode, kommt es zur Aktivierung der Kanäle. Hyperosmolarität, mit daraus folgender Zellvolumenabnahme führt zur Inaktivierung der *TREK*-Kanäle. Außerdem sind diese Kanäle thermosensibel: Hitze aktiviert *TREK*-Kanäle. (Honoré et al., 2002; Maingret et al., 2000) Die *TREK*-Kanäle unterliegen über Gq/11-, Gs- und Gi-gekoppelte Rezeptoren auch dem Einfluss verschiedener Neurotransmitter. Eine Aktivierung des Glutamat-Rezeptors mGluR1 (Gq) bzw. des Serotonin-Rezeptors 5-HT₄sR (Gs) führt zur Inhibition koexprimierter *TREK*-Kanäle. Eine Kopplung an den Glutamat-Rezeptor mGluR2 (Gi) führt bei entsprechender Rezeptorstimulation zu einer Aktivierung (Lesage, 2003). Darüber hinaus nimmt *TREK-1* eine Sonderrolle unter allen bekannten Ionenkanälen ein: Nach Phosphorylierung durch die PKA verwandelt er sich von einem Leckkanal in einen spannungssensitiven Auswärtsgleichrichter. In diesem Zustand kann ein signifikanter Auswärtsstrom nur bei Membranpotenzialen oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes gemessen werden. *TREK-1* trägt so zur Repolarisation bei und erleichtert repetitive Erregungen (Bockenhauer et al., 2001).

7.2 Gewebsexpression der 2PD-K⁺-Kanäle

Es existiert mittlerweile ein hinreichend exaktes Bild von der Verteilung der 2PD-K⁺-Kanäle im Säugerorganismus. Einen groben Überblick über die Verteilung im Organismus liefert Tab. 1.4.

Für diese Arbeit besonders interessant sind die 2PD-K⁺-Kanäle, die im ZNS, dem Hauptwirkort der Inhalationsanästhetika exprimiert werden. Hier finden sich für die entsprechenden Kanäle charakteristische Verteilungsmuster in den einzelnen Hirnabschnitten. Auf zellulärer Ebene werden die 2PD-K⁺-Kanäle hier in erster Linie in Neuronen exprimiert, ausnahmsweise aber auch in anderen Zelltypen des zentralen Nervensystems wie Plexuszellen (*TWIK-1*), Ependymzellen (*TREK-2*) oder der pia mater (*TREK-1*) (Talley *et al.*, 2001). Analysen auf subzellulärer Ebene konnten zeigen, dass die 2PD-K⁺-Kanäle in Neuronen vor allem in Membranabschnitten im Bereich von Synapsen integriert werden (Callahan *et al.*, 2004).

Interessanterweise exprimieren die 2PD-K⁺-Kanäle in den Kompartimenten in besonders hoher Dichte, die an Funktionen wie Aufmerksamkeit, Gedächtnis, Schlaf-Wach-Rythmus, aber auch Motorik beteiligt sind.

TASK-1, *TASK-2*, *TASK-3*, *TREK-1* und *TRAAK* finden sich in unterschiedlicher Häufigkeit in Hippocampus, Cerebellum, Neokortex, in Motoneuronen des Rückenmarks und der Hirnnervenkerne (Bayliss *et al.*, 2001; Callahan *et al.*, 2004; Hervieu *et al.*, 2001; Karschin C. *et al.*, 2001; Kindler *et al.*, 2000; Medhurst *et al.*, 2001; Reyes *et al.*, 2000).

Auch für *THIK-1* konnte die Expression im zentralen Nervensystem der Ratte gezeigt werden, mit hoher Dichte jedoch nur im Gyrus dentatus des cerebellum (Rajan *et al.*, 2001).

TRESK konnte beim Menschen bisher ausschließlich aus Nervenzellen des Rückenmarkes isoliert werden (Sano *et al.*, 2003).

THIK-1	Gehirn, Herz, Lunge, Niere, Leber, Milz
THIK-2	Gehirn, Lunge, Leber, Milz, Herz, Urogenital-, Gastrointestinaltrakt, Plazenta, Thymus
TASK-1	Gehirn, Herz, Lunge, Niere, Gastrointestinaltrakt, Pankreas, Prostata, Uterus, Plazenta
TASK-3	Gehirn
TASK-5	Gehirn, Herz, Lunge, Niere, Leber, Pankreas, Nebenniere, Schilddrüse, Speicheldrüsen, Plazenta
TASK-2	Gehirn, Niere, Leber, Pankreas, Gastrointestinaltrakt, Plazenta
TALK-1	Pankreas, Lunge, Leber, Pankreas, Plazenta
TALK-2	Pankreas, Leber, Herz, Lunge, Plazenta
TWIK-1	Gehirn, Herz, Lunge, Niere, Leber, Plazenta
TWIK-2	Herz, Pankreas, Plazenta
KCNK7	Auge, Lunge
TREK-1	Gehirn, Herz
TREK-2	Gehirn, Niere, Pankreas, Milz, Hoden, Prostata, Thymus, Leber, Herz
TRAAK	Gehirn, Niere, Muskel, Leber, Lunge, Urogenitaltrakt, Plazenta
TRESK	Rückenmark

Tab. 1.4: Gewebsexpression der 2PD-K⁺-Kanäle beim Menschen (Bang *et al.*, 2000; Goldstein *et al.*, 2001; Goldstein *et al.*, 2005; Karschin A., 2001, Sano *et al.*, 2003).

Danksagung

Ich danke allen, die mich bei der Vorbereitung und Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben und die dazu beigetragen haben, dass ich mich bei meiner Tätigkeit am Institut für Physiologie so wohl gefühlt habe, insbesondere:

Herrn Prof. Dr. Andreas Karschin, der mir dieses Thema überließ, den Verlauf mit förderndem Interesse begleitete und mir wertvolle Hilfen zu den Feinheiten einer wissenschaftlichen Arbeit gab,

Herrn Prof. Dr. Erhard Wischmeyer, der viel Zeit investierte, mir das wissenschaftliche Arbeiten näher zu bringen, der mir jederzeit mit großem Interesse für Fragen, hilfreiche Diskussionen und Anregungen zur Verfügung stand und so die Entstehung dieser Arbeit erst ermöglichte,

Frau Dr. Elke Wischmeyer und **Herrn Dr. Volker Schmitt**, die theoretisch (in vielen interessanten Diskussionen und mit wichtigen Ideen) aber vor allem auch praktisch (über die Durchführung der verschiedenen Mutationen und Hilfestellungen bei molekularbiologischen Arbeiten) wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen,

Frau Tanja Martini, die mir eine unverzichtbare Hilfe bei der Arbeit im Labor war und mir jeder Zeit mit Rat und Tat zur Verfügung stand,

Herrn Prof. Dr. Herrmann Koepsell und seinen Mitarbeitern am Anatomischen Institut der Universität Würzburg, die mir über lange Zeit die von ihnen präparierten *Xenopus*-Oozyten überließen,

Herrn Dr. Frank Döring, Frau Dr. Maruschka Weber und **Herrn Dr. Matthias Pawlak**, die mich bei meiner Arbeit mit vielen hilfreichen Diskussionen konstruktiv unterstützten,

Frau Tatjana Hoffmann, Frau Heike Lorenz, Frau Maria Oppmann, Frau Brigitte Trost, Frau Patricia Seeberger, die mich in die praktische Laborarbeit einführten und immer einer offenes Ohr für mich hatten,

meiner Familie und meinen Freunden, auf deren Unterstützung ich mich jeder Zeit verlassen konnte und die alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit mit mir bestritten.

Lebenslauf

ANGABEN ZUR PERSON

Name: Katharina Barbara Oehrlein
Wohnort: Wolfgang-Stock-Str. 6
72076 Tübingen
Geboren: am 22.11.1980 in Schweinfurt
Familienstand: Ledig
Nationalität: Deutsch

AUSBILDUNG

1986 – 1990: Besuch der Verbandschule Margetshöchheim
1990 – 1999: Besuch des städtischen Mozartgymnasiums in Würzburg
Juni 1999: Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
September 1999: Immatrikulation an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg im Fach Humanmedizin
August 2001: Ärztliche Vorprüfung
August 2002: Erstes Staatsexamen
Februar 2003: Beginn der vorliegenden Dissertationsarbeit am Institut für Physiologie an der Universität Würzburg, Lehrstuhl für Physiologie II unter der Leitung von Prof. Dr. A. Karschin und Betreuung durch Prof. Dr. E. Wischmeyer.

März 2005: Zweites Staatsexamen
April 2005 – August 2005: 1. Teil des Praktischen Jahres im Fach Chirurgie in der chirurgischen Klinik der Stiftung Juliusspital Würzburg
August 2005 – November 2005: 2. Teil des Praktischen Jahres im Fach Innere Medizin am Centre Hospitalier Universitaire in Caen (Frankreich)
November 2005 – März 2006: 3. Teil des Praktischen Jahres im Fach Kinder- und Jugendpsychiatrie (Wahlfach) an der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie der Universitätsklinik Würzburg

Mai 2006: Drittes Staatsexamen
Oktober 2006: Abschluss der Dissertationsarbeit

BERUFLICHER WERDEGANG

seit August 2006: Wissenschaftliche Mitarbeiterin mit überwiegend ärztlichen Tätigkeiten am Universitätsklinikum Tübingen, Medizinische Universitätsklinik, Abteilung für Innere Medizin II (Rheumatologie, klinische Immunologie, Hämatologie/Onkologie)

K. Oehrlein