

**Aus dem Institut für Physiologie der Universität Würzburg
- Lehrstuhl für Physiologie II -
Komm. Vorstand: Prof. Dr. Erhard Wischmeyer**

**Wirkung von Cannabinoiden
auf die
Tandemporenkaliumkanäle
TASK-1 und TASK-3**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
medizinischen Fakultät
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Sabrina Kugler
aus Würzburg**

Würzburg, Februar 2008

Referent: Prof. Dr. Erhard Wischmeyer

Koreferent: Prof. Dr. Hermann Koepsell

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 27.05.2008

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Cannabinoide – Wirkung und Rezeptoren	1
1.1.1 Klassische Cannabinoide	1
1.1.2 Nichtklassische Cannabinoide	3
1.1.3 Eicosanoide	3
1.1.4 Aminoalkylindole	5
1.2 Kaliumkanäle	5
1.2.1 Funktion	5
1.2.2 Einteilung	6
1.2.3 Tandemporenkaliumkanäle	7
Struktur	8
Klassifikation	8
Physiologische und elektrophysiologische Eigenschaften	9
TASK-1 und TASK-3	10
1.4 Zielsetzung der Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Molekularbiologische Methoden	13
2.1.1 Transformation	13
2.1.2 Isolierung der Plasmid-DNA	14
2.1.3 In vitro-Transkription	14
Linearisierung	14
Phenol-Chloroform-Extraktion	15
Transkription in mRNA	16
2.2 Elektrophysiologische Methoden	17
2.2.1 Salzlösungen	17
2.2.2 Stammlösungen der pharmakologischen Substanzen	18
2.2.3 Vorbereitung der Xenopus Oozyten	18
Injektion von mRNA	18
2.2.4 Methode der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC)	19
2.2.5 Aufbau des Messstandes	20
2.2.6 Herstellung der Ableitelektroden	22
2.2.7 Messprotokolle	22
Strom-Spannungskurven	22

Repetitive Spannungssprünge	23
2.2.8 Applikation der Perfusionslösungen	24
2.3 Auswertung der Daten	25
2.3.1 Statistik	25
2.3.2 Bestimmung der Dosis- Wirkungs- Beziehungen	25
2.3.3 Graphische Darstellung	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Wirkung von Cannabinoiden auf die Tandemporenkaliumkanäle TASK-1 und TASK-3	27
3.1.1 TASK-1 und Anandamid	27
3.1.2 TASK-1 und WIN55,212-2	28
3.1.3 TASK-1 und Arachidonsäure	30
3.1.4 Wirkungen von Anandamid, WIN55,212-2 und Arachidonsäure auf den TASK-3	31
3.2 Wirkung von Cannabinoiden auf TASK-1-Mutanten	32
3.2.1 TASK-1 [Δ 243-248]	32
3.2.2 TASK-1 [Δ 249-390RSSV]	34
3.3 Wirkung von Cannabinoiden auf TASK-3-Mutanten	36
3.3.1 TASK-3 [Δ 243-248]	36
3.3.2 TASK-3 [L247M]	37
4 Diskussion	39
Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen TASK-1 und Anandamid, WIN55,212-2 und Arachidonsäure	39
Funktionelle Bedeutung der C-terminalen Aminosäuren 243-248 von TASK-1 und TASK-3	41
Schlußfolgerungen	44
5 Zusammenfassung	45
6 Literaturverzeichnis	47

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Interaktion von Cannabinoiden mit Kaliumkanälen aus der Gruppe der Tandemporenkaliumkanäle. Diese Kaliumkanäle sind von besonderer Bedeutung, da sie an der Einstellung des Ruhepotenzials von Neuronen beteiligt sind. Auf diese Weise können Tandemporenkaliumkanäle auf die neuronale Erregbarkeit Einfluss nehmen. Sie selbst werden durch unterschiedliche Substanzen in ihrer Aktivität beeinflusst, insbesondere durch Halothan und Cannabinoide.

1.1 Cannabinoide – Wirkung und Rezeptoren

Cannabinoide sind aktivierende Liganden des Cannabinoid-Rezeptors. Sie lassen sich in vier chemische Gruppen einteilen: klassische Cannabinoide, nichtklassische Cannabinoide, Eicosanoide und Aminoalkylindole.

1.1.1 Klassische Cannabinoide

Klassische Cannabinoide sind Dibenzopyranderivate und sind entweder pflanzliche Cannabinoide oder synthetische Analoge. Zu den pflanzlichen Cannabinoiden gehört insbesondere das Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) (Abb.1.1).

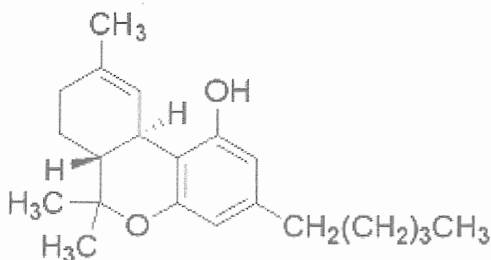


Abb. 1.1: Strukturformel von Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)

Es wird aus indischem Hanf gewonnen und ist der psychopharmakologisch aktive Bestandteil von Marihuana und Haschisch, wie 1964 erstmals gezeigt werden konnte (Gaoni und Mechoulam, 1964). Marihuana und Haschisch werden aus den

getrockneten Blütenblättern (Marihuana) bzw. dem getrockneten Blütenharz (Haschisch) der Hanfpflanze hergestellt und meist geraucht, seltener mit Getränken oder Nahrungsmitteln vermischt. Die Wirkung unterliegt verschiedenen Einflussgrößen wie der Umgebung, der Persönlichkeitsstruktur, der Applikationsart und nicht zuletzt der Dosis. Beschrieben werden nach einem Gefühl der Spannung oder Erregung Zustände mit scheinbar gesteigerter Wahrnehmungsfähigkeit bis hin zu Wahnvorstellungen. Als ebenfalls typisch gelten Gedächtnis- und Denkstörungen, motorische Störungen und eine verminderte Schmerzempfindung (Pertwee, 1997; Mutschler et al., 2001).

Nachdem es 1988 gelang, die Existenz eines spezifischen Cannabinoid-Rezeptors zu beweisen (Devane et al., 1988), wurde der Cannabinoid-Rezeptor CB₁ im Jahr 1990 kloniert (Matsuda et al., 1990). Die Klonierung des Cannabinoid-Rezeptors CB₂ erfolgte im Jahr 1992 (Munro et al., 1993).

Der CB₂-Rezeptor wurde in peripheren Geweben insbesondere in Thymus, Tonsillen und Knochenmark nachgewiesen, mit der höchsten mRNA-Konzentration in B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (Herkenham et al., 1991 und Mailleux et al., 1992 in Gaffal, 2003). Der CB₁-Rezeptor konnte hingegen nicht nur in zahlreichen peripheren Geweben, sondern vor allem im zentralen Nervensystem (ZNS) nachgewiesen werden. Hier wurden besonders hohe Rezeptorkonzentrationen in der Großhirnrinde, im Hippocampus, in den Basalganglien und im Kleinhirn gefunden (Pertwee, 1997).

Cannabinoid-Rezeptoren sind membranständige Proteine mit sieben hydrophoben Helices, die die Zellmembran durchspannen. Über die α -Untereinheit eines G_i-Proteins (inhibitorisches Guanin-Nukleotid bindendes Protein) hemmen beide Varianten des Rezeptors das Enzym Adenylatzyklase und damit die Bildung von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat). Der CB₁-Rezeptor aktiviert zusätzlich Kaliumkanäle, was zu einer Hyperpolarisation der Zellen und dadurch im ZNS zu einer verminderten Entstehung von Aktionspotenzialen in Neuronen führt. Er hemmt darüber hinaus Calciumkanäle und vermindert auf diese Weise die Ausschüttung von Neurotransmittern im ZNS. So konnte gezeigt werden, dass Cannabinoide im Hippocampus über den CB₁-Rezeptor die Freisetzung von Acetylcholin und auch von Glutamat senken, was die negativen Effekte von Marihuana auf Lern- und Gedächtnisleistungen erklären könnte (Gifford und

Ashby, 1996; Shen et al., 1996; Gessa et al., 1997). In Übereinstimmung mit dem analgetischen Effekt von Cannabinoiden wurden die Rezeptoren auch in Schmerzbahnen von Großhirnrinde und Rückenmark nachgewiesen (Pertwee, 2001). An peripheren sympathischen Nervenendigungen hemmen Cannabinoide über den CB₁-Rezeptor die Exocytose von Noradrenalin, wodurch ihre Blutdruck senkenden Eigenschaften erklärt werden könnten (Ishac et al., 1996).

1.1.2 Nichtklassische Cannabinoide

Nichtklassische Cannabinoide (CP-55,940, CP-55,244 u.a.) bestehen aus bicyclischen oder tricyclischen Analogen des Δ^9 -THC ohne Pyranring, ähneln also in ihrer Struktur den klassischen Cannabinoiden. Sie werden experimentell eingesetzt. Mit Hilfe von radioaktiv markiertem CP-55,940 wurde ursprünglich der Beweis für die Existenz eines Cannabinoid-Rezeptors erbracht (Devane et al., 1988).

1.1.3 Eicosanoide

Eicosanoide sind eine zu den Fettsäuren gehörende Gruppe von Mediatoren mit unterschiedlicher biologischer Wirkung. Die Ausgangssubstanz aller Eicosanoide ist die vierfach ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure (Abb.1.2), die 20 Kohlenstoffatome besitzt (*eikosi*; griech.=20). Sie wird durch eine spezifische, regulierbare Phospholipase A₂ aus Membranphospholipiden abgespalten.

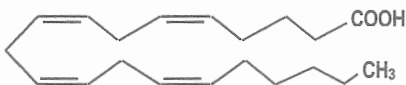


Abb.1.2: Strukturformel von Arachidonsäure

Wichtige Eicosanoide sind die Arachidonsäure selbst und deren Derivate, nämlich Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane. Sie sind beteiligt an:

- Entzündungsreaktionen, allergischen Reaktionen
- Entstehung von Schmerz und Fieber
- Kontraktion der glatten Muskulatur
- Thrombozyten-Aggregation

Auf der Suche nach einem körpereigenen Liganden für den Cannabinoid-Rezeptor isolierten Devane et al. (1992) aus dem Schweinegehirn ein Fettsäurederivat. Dabei handelte es sich um ein zuvor unbekanntes Eicosanoid, ein Amid aus Arachidonsäure und Ethanolamin, das Arachidonylethanolamid (AEA). Dieses war der erste nachgewiesene körpereigene Ligand des Cannabinoid-Rezeptors und wurde von seinen Entdeckern auch Anandamid genannt: „Ananda“ ist Sanskrit und bedeutet „Ursache innerer Seeligkeit und Ruhe“, „amid“ steht für die chemische Struktur (Abb.1.3). Die Bildung von Anandamid soll in zwei Schritten erfolgen (Piomelli D, 2003): Im ersten Schritt soll durch eine N-Acyltransferase aus Arachidonsäure und Phosphatidylethanolamin N-Arachidonyl-Phosphatidylethanolamin entstehen. Im zweiten Schritt folgt dann durch eine Phospholipase D die Abspaltung von Arachidonylethanolamid (Anandamid). Es wurden weitere natürlicherweise vorkommende biologisch aktive Liganden des Cannabinoid-Rezeptors im Säugetiergehirn sowie in verschiedenen anderen Geweben nachgewiesen (Howlett et al., 2002). Dazu zählen neben Anandamid das 2-Arachidonylglycerol (2-AG) und 2-Arachidonylglyceroläther (Noladin). Man bezeichnete sie als „Endocannabinoide“ in Anlehnung an die zuvor entdeckten „Endomorphine“, deren Rezeptoren ebenfalls Targets für sowohl exogen zugeführte Substanzen (Morphinderivate) als auch für endogen synthetisierte Liganden (Met- und Leu-Enkephalin, β -Endomorphin) darstellen (Piomelli, 2003).

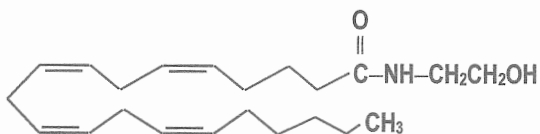


Abb.1.3: Strukturformel von Arachidonylethanolamid (AEA, Anandamid)

Anandamid kann nicht nur in Hirnregionen mit hoher CB_1 -Rezeptordichte – wie im Hippocampus, Striatum und Cerebellum - sondern u.a. auch im Thalamus (Felder et al., 1996) nachgewiesen werden. Außerdem konnte an CB_1 -Rezeptor Knockout-Mäusen gezeigt werden, dass einige Wirkungen von Δ^9 -THC z.B. Analgesie und Diarrhoe rezeptorunabhängig erfolgen (Zimmer et al., 1999). Di Marzo et al. (2000) haben nachgewiesen, dass Anandamid auch bei CB_1 -Rezeptor Knockout-Mäusen

Analgesie und verminderte Spontanaktivität verursacht. Diese Beobachtungen weisen auf rezeptorunabhängige Interaktionen der Cannabinoide mit weiteren Proteinen hin, was für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung ist, da eine rezeptorunabhängige, direkte Inhibition von Kaliumkanälen nachgewiesen werden soll.

1.1.4 Aminoalkylindole

Diese Gruppe enthält Verbindungen, die sich strukturell von den klassischen oder nichtklassischen Cannabinoiden unterscheiden (Pertwee, 1999). Der Prototyp der Aminoalkylindole ist das synthetische WIN55,212-2 (Abb1.4). WIN55,212-2 ist ein potenter Rezeptoragonist. Effekte wurden bereits im Bereich zwischen 0,1-1000 nM beschrieben (Pacheco et al., 1991). Es gilt als klassischer selektiver Ligand für experimentelle Untersuchungen.

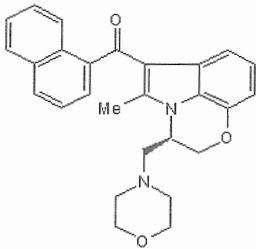


Abb.1.4: Strukturformel von WIN55,212-2

1.2 Kaliumkanäle

1.2.1 Funktion

Kaliumkanäle sind ubiquitär vorkommende Proteinkomplexe, die in biologischen Membranen K^+ -selektive Poren bilden und den passiven Transport von K^+ -Ionen über die Zellmembran ermöglichen.

Während die Zellmembran unter Ruhebedingungen kaum durchlässig für Na^+ -Ionen ist, macht die Leitfähigkeit für K^+ -Ionen in neuronalen Zellen etwa 90% der Gesamtleitfähigkeit aus. Die Offenwahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen ist unter Ruhebedingungen also relativ hoch, so dass K^+ -Ionen dem Konzentrationsgefälle

folgend von intra- nach extrazellulär diffundieren. Dabei entsteht durch den Austritt positiver Ladungen ein Diffusionspotenzial, das in ausgeglichenem Zustand als K^+ -Gleichgewichtspotenzial bezeichnet wird und annähernd dem neuronalen Ruhepotential entspricht. Es liegt bei Säugetierzellen zwischen -50 und -100 mV. Kaliumkanäle sind an der Kontrolle des Zellvolumens und der Sekretion von Salz, Hormonen und Neurotransmittern beteiligt. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Modulation der Erregbarkeit von Muskelzellen und Neuronen (Lesage und Lazdunski, 2000; Silbernagl und Despopoulos, 2001).

1.2.2 Einteilung

Es existieren verschiedene Einteilungsmöglichkeiten für die große Gruppe von Kaliumkanälen. Ursprünglich unterschied man die in vivo gemessenen K^+ -Ströme hinsichtlich ihrer funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften. In den 90er Jahren wurde dann durch Klonierungsarbeiten die Struktur vieler dieser Kanäle aufgedeckt (Lesage und Lazdunski, 2000). Allen Kaliumkanälen gemeinsam ist ein konservierter Abschnitt, der P-Domäne (Porendomäne, porenbildende Domäne) genannt wird und Teil des K^+ -Transportweges ist.

Die Kaliumkanal-Untereinheiten beim Säuger (ca. 90 Gene) können anhand ihrer Membrantopologie in drei strukturell unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden (Patel und Honoré, 2001a; Lesage und Lazdunski, 2000):

Die erste und größte Gruppe von Kaliumkanälen besitzt Untereinheiten mit sechs Transmembrandomänen (6TMS) und einer porenbildenden Domäne (1P) (Abb.1.5).

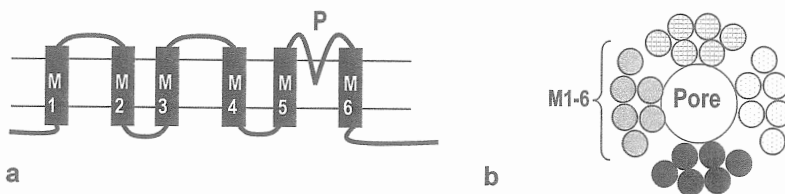


Abb.1.5: Membrantopologie eines Kaliumkanals mit sechs Transmembrandomänen (M1-M6) und einer Porendomäne (P). a: Schematische Darstellung einer Untereinheit. b: Aufsicht auf den aus vier Untereinheiten formierten Kaliumkanal. Die einzelnen Untereinheiten sind farblich abgegrenzt.

Dazu gehören die spannungsgesteuerten K^+ -Kanäle (K_v) sowie die Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle (K_{Ca}) mit geringer (SK_{Ca}) bzw. mittlerer (IK_{Ca}) Leitfähigkeit (SK_{Ca}/IK_{Ca} = small-conductance/intermediate-conductance calcium-activated potassium channel) (Ghatta et al., 2006). Die funktionsfähigen Proteine werden dabei aus einer tetrameren Anordnung dieser 6TM/1P-Untereinheiten gebildet und besitzen eine Pore (Lesage und Lazdunski, 2000). Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK_{Ca} =big-conductance calcium-activated potassium channel) besitzen noch eine zusätzliche Transmembrandomäne (Meera et al., 1997). Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle werden bei Depolarisation aktiviert und sind hauptsächlich an der Repolarisation beteiligt (Patel und Honoré, 2001a).

Die zweite Gruppe von Kaliumkanälen setzt sich aus Untereinheiten mit zwei Transmembrandomänen und einer Porendomäne (2TMS/1P) zusammen (Abb.1.6). Sie bilden als homo- oder heterotetramere Membranproteine einwärtsgerichtete K^+ -Kanäle (K_{ir}) und als Sonderform ATP-sensitiven K^+ -Kanäle (K_{ATP}) mit jeweils einer Pore (Gutman et al., 2003). Die physiologische Funktion der sogenannten einwärtsgerichteten K^+ -Kanäle besteht in der Stabilisierung des Ruhemembranpotenzials. Dabei leiten sie Kaliumionen nach außen. Ihr Name ist historisch bedingt und insofern irreführend.



Abb.1.6: Membrantopologie eines Kaliumkanals mit zwei Transmembrandomänen (M1-M2) und einer Porendomäne (P). A: Schematische Darstellung einer Untereinheit. **B:** Aufsicht auf den aus vier Untereinheiten formierten Kaliumkanal. Die einzelnen Untereinheiten sind farblich abgegrenzt.

Die dritte Gruppe von Kaliumkanälen sind die Tandemporenkaliumkanäle.

1.2.3 Tandemporenkaliumkanäle

Tandemporenkaliumkanäle werden aus Untereinheiten mit vier Transmembrandomänen und zwei Porendomänen gebildet. Die Untereinheiten lagern sich zu Dimeren zusammen und bilden so funktionsfähige Kaliumkanäle mit einer funktionellen Pore (Lesage und Lazdunski, 2000). Aufgrund ihrer

ungewöhnlichen Struktur wurden sie Tandemporenkaliumkanäle oder 2PD-K⁺-Kanäle genannt.

Struktur

Allen Tandemporenkaliumkanälen ist gemeinsam, dass sich ihre Kanal-Untereinheiten aus zwei Porendomänen (P1 und P2) zusammensetzen, die jeweils von zwei membrandurchspannenden α -helikalen Segmenten (M1-4) flankiert werden (Abb.1.7). Ein kurzer N-Terminus und ein langer C-Terminus ragen ins Zytoplasma, während sich extrazellulär eine konservierte Schleife zwischen M1 und P1 befindet. Diese Schleife ist essentiell für die Dimerisation der Untereinheiten, die über Disulfidbrücken zwischen dort vorhandenen Cysteinresten gebildet wird (Lesage et al., 1996). Trotz der großen strukturellen Ähnlichkeit sind die bei Säugern zwischen 307 und 499 Aminosäuren langen Proteine in ihrer Sequenz nur mäßig (20-50%) homolog (Karschin, 2001; Goldstein et al., 2001).

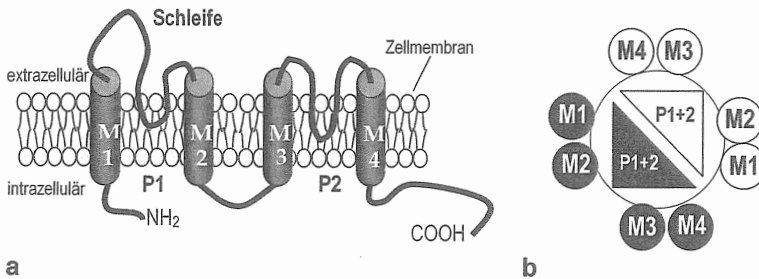


Abb.1.7: Membrantopologie eines Tandemporen- Kaliumkanals. A: Zwei transmembranäre Segmente (M1 und 2 bzw. M3 und M4) flankieren jeweils eine Porendomäne (P1 und P2). Auf der extrazellulären Seite befindet sich zwischen M1 und P1 eine Schleife. **B:** Aufsicht auf den aus zwei Untereinheiten formierten 2PD-K⁺-Kanal mit einer Pore. Die einzelnen Untereinheiten sind farblich abgegrenzt.

Klassifikation

Bei der Einteilung der Tandemporenkaliumkanäle werden verschiedene Nomenklaturen verwendet. Das *Human Genome Nomenclature Committtee* (HGNC) gab den bisher 15 beim Menschen beschriebenen Genen das Präfix *KNCK* und verlieh jedem einzelnen Gen eine eigene Nummer in der Reihenfolge der Entdeckung (*KNCK 1-17*). Der Nachteil dieser Einteilung besteht darin, dass

sie keine Aussage über Sequenz oder Funktion zulässt. Eine andere Einteilung verwendet Akronyme, die von den entscheidenden physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften abgeleitet werden (Talley et al., 2003). Diese Einteilung findet auch in der vorliegenden Arbeit Verwendung.

Es wurden bisher 15 verschiedene Tandemporenkaliumkanäle beim Menschen beschrieben, die in sechs Untergruppen eingeteilt werden können (Tab. 1.1 und Abb. 1.8).

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

Tab.1.1: Einteilung der 2PD-K⁺-Kanäle unter Verwendung von Akronymen.

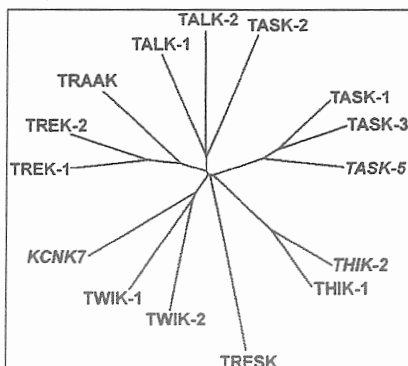


Abb.1.8: Phylogenetischer Stammbaum der bekannten menschlichen 2PD-K⁺-Kanäle (aus Patel und Honoré, 2001a). Die kursiv geschriebenen Kanäle KCNK7, THIK-2 und TASK-5 konnten in heterologen Systemen bisher nicht exprimiert werden.

Physiologische und elektrophysiologische Eigenschaften

Tandemporenkaliumkanäle sind für die sogenannten Leckströme oder Hintergrundströme verantwortlich, die bereits 1952 in Neuronen beschrieben wurden (Hodgkin et al., 1952). Sie haben eine relativ geringe Amplitude, sind hoch

kaliumselektiv, kaum spannungs- oder zeitabhängig und unempfindlich gegenüber den meisten klassischen Kaliumkanal-Blockern wie Tetraethylammonium (TEA), 4-Aminopyridin (4-AP) und Caesium (Cs^{++}). Ihre Strom-Spannungskennlinien bei unterschiedlichen K^+ -Konzentrationen lassen sich mit der Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung genau beschreiben (Duprat et al., 1997; Patel and Honoré, 2001a; Karschin, 2001; O'Connell et al., 2002). Unter physiologischen Bedingungen ist die extrazelluläre K^+ -Konzentration deutlich niedriger als die intrazelluläre, so dass an Zellen mit Tandemporenkaliumkanälen entsprechend dem Konzentrationsgefälle ein Auswärtsstrom gemessen werden kann.

Die Bedeutung dieser Kanalfamilie liegt in der Stabilisierung des Membranpotenzials bzw. des Ruhepotenzials bei Neuronen (Lesage und Lazdunski, 2002). Da sie auch bei Depolarisation Kalium nach außen leiten, sind Tandemporenkaliumkanäle auch an der Rückbildung des Aktionspotenzials beteiligt (Patel und Honoré, 2001a, b; Karschin, 2001).

Die Aktivität der 2PD- K^+ -Kanäle wird von vielen unterschiedlichen Einflussgrößen moduliert. Dazu gehören Veränderungen des intra- und extrazellulären pH-Wertes, Temperaturveränderungen, Hypoxie, bioaktive Lipide, Neurotransmitter und Inhalationsanästhetika (Übersicht bei Lazdunski, 2003).

TASK-1 und TASK-3

Auch Endocannabinoide spielen bei der Modulation von 2PD- K^+ -Kanälen eine Rolle. Maingret et al. (2001) konnten zeigen, dass der pH-sensitive 2PD- K^+ -Kanal TASK-1, der wie alle TASK-Kanäle charakteristischerweise durch extrazelluläre Azidose inhibiert wird, selektiv von dem Endocannabinoid Anandamid gehemmt wird. Diese Hemmung scheint direkt zu erfolgen, unabhängig von den Cannabinoid-Rezeptoren CB_1 und CB_2 . Dies wurde daraus geschlossen, dass die Hemmung nicht von dem spezifischen CB_1 -Rezeptor-Antagonisten SR141716A beeinflusst wird, und dass zwar die Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten WIN55,212-2 und CP55940 einen inhibitorischen Effekt haben, nicht aber andere starke Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten wie Δ^9 -THC, HU210 und 2-Arachidonylglycerol. Die hemmende Wirkung von Anandamid ist dabei unabhängig von G-Proteinen, von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der Phosphorylierung des TASK-1

(Maingret et al., 2001). Eine geringe inhibitorische Wirkung von Anandamid konnte auch beim TASK-3 beobachtet werden.

Die beiden Tandemporenkaliumkanäle TASK-1 und TASK-3 weisen eine Sequenzhomologie von >50% auf (Rajan et al., 2000; Talley und Bayliss, 2002; Talley et al., 2003). Talley und Bayliss (2002) untersuchten die Modulation von TASK-1 und TASK-3 durch Inhalationsanästhetika und Neurotransmitter und fanden in Mutationsstudien heraus, dass die Aminosäuren in Position 243-248 von TASK-1 und von TASK-3, die im C-Terminus nach der letzten Transmembrandomäne liegen (Abb.1.9), für die aktivierende Wirkung von Halothan sowie für die inhibitorische Wirkung von TRH (Thyreotropin Releasing Hormon) von Bedeutung sind. Um zu untersuchen, ob diese Aminosäuresequenz für die Wirkung von Cannabinoiden auf die beiden Tandemporenkaliumkanäle ebenfalls von Bedeutung ist, wurden in der vorliegenden Arbeit Mutationsexperimente und nach Expression der entsprechenden mRNA in Xenopus Oozyten elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt.

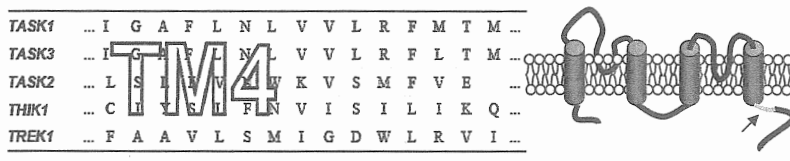


Abb.1.9: Sequenzvergleich verschiedener Tandemporenkaliumkanäle. Rechts: Am Übergang von der vierten Transmembrandomäne zum C-Terminus befindet sich ein Sequenzmotiv (Aminosäuren 243-248), das mit Ausnahme einer Aminosäure bei TASK-1 und TASK-3 übereinstimmt (dunkelgrau unterlegt). Die anderen 2PD-K⁺-Kanäle weisen dieses Motiv nicht auf. **Links:** Schematische Darstellung einer Untereinheit. Die Aminosäuren in Position 243-248 sind farblich abgegrenzt (Pfeil).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ausgehend von den von Maingret et al. (2001; s.o.) sowie von Talley und Bayliss (2002; s.o.) erhobenen Befunden sollte in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Cannabinoiden auf die 2PD-K⁺-Kanäle TASK-1 und TASK-3 genauer untersucht werden. Unter Verwendung eines heterologen Expressionssystems sollten elektrophysiologische Messungen durchgeführt werden. Dazu wurden unveränderte bzw. deletierte cDNA-Klone von 2PD-K⁺-Kanälen der Ratte in *Xenopus* Oozyten exprimiert. Es sollte herausgefunden werden:

1. welche Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Anandamid, WIN55,212-2 und Arachidonsäure und den unveränderten 2PD-K⁺-Kanälen TASK-1 und TASK-3 besteht.
2. ob die Aminosäuren 243-248 von TASK-1 und TASK-3 für die Interaktion mit Cannabinoiden von Bedeutung sind. Dazu wurde die Wirkung von Anandamid, WIN55,212-2 und Arachidonsäure auf entsprechende Deletionsmutanten von TASK-1 und TASK-3 elektrophysiologisch untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

Die zur Herstellung injizierbarer mRNA notwendigen cDNA-Klone wurden zur Verfügung gestellt: TASK-1 (Ratte) von C. Derst (Marburg); TASK-3 (Ratte) von Dr. E. Wischmeyer (Physiologisches Institut, Würzburg); Deletionsmutanten TASK-1 [Δ 243-248], TASK-1 [Δ 249-390RSSV], TASK-3 [Δ 243-248] und TASK-3 [L247M] von Dr. E. Wischmeyer, Dr. V. Schmidt (Physiologisches Institut, Würzburg) und Dr. R. Preissig-Müller (Physiologisches Institut, Marburg).

2.1.1 Transformation

Die Plasmidpräparation erfolgte durch Dr. Elke Wischmeyer und Dr. Volker Schmidt (Physiologisches Institut Würzburg). Für die Klonierung wurde der Vektor pSGEM verwendet.

Zur Transformation wurden 200 μ l kompetente Bakterien (Tab.2.1) mit 100 ng DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte eine Erwärmung der Tubes im Thermoblock für 45 sec bei 42°C und anschließende Abkühlung für 1 min auf Eis. Nach Zugabe von 400 μ l LB-Medium (Tab.2.1) zum Transformationsansatz folgte eine einstündige Inkubation im Warmschüttler bei 37°C in Schräglage. Vorgewärmte Agarplatten mit Ampicillin (50mg/ml in H₂O) (Tab.2.1) dienen als Nährboden während der anschließenden Inkubation im Brutschrank bei 37°C über Nacht.

LB-Medium	Caseinhydrolysat	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	Aqua bidest	ad 1 l
LB/Amp-Agar-Platten	LB-Medium	1 l
	Agar	15 g
	Ampicillin	100 μ g/ml
Bakterienstamm	E. coli XL2-blue	

Tab.2.1: Bakterien und Medien für die Transformation.

2.1.2 Isolierung der Plasmid-DNA

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde das Protokoll *QIAGEN*[®] Plasmid Midi (*Qiagen*, Hilden, Deutschland) verwendet. Zunächst wurde eine Einzelkolonie des Plasmid-tragenden Bakterienstammes ausgewählt. Mit dieser wurden dann 3ml LB-Medium (mit 3µl Ampicillin) angeimpft und etwa 7 h bei 37°C im Wärmeschüttler (*Edmund Bühler SM-30*) als Vorkultur inkubiert. Danach wurden 50 ml LB-Medium (mit 50 µl Ampicillin) mit 500 µl aus der Vorkultur beimpft und über Nacht im Wärmeschüttler bei 37°C inkubiert.

Durch Zentrifugation (*Beckmann J2-MC*, 8 min, 8000 rpm, 4°C) wurde aus der Bakteriensuspension ein Bakteriensediment gewonnen. Die im Sediment enthaltene DNA wurde nach dem Protokoll *QIAGEN*[®] Plasmid Midi Kit 100 aufgereinigt, in 200-300 µl Wasser (DEPC- behandelt) aufgenommen und gelöst. Zur Objektivierung von Ausbeute und Reinheit erfolgte eine photometrische Extinktionsmessung bei 260 nm (*Biometra UNO II*).

2.1.3 In vitro-Transkription

Linearisierung

Zunächst erfolgte die Linearisierung des isolierten Plasmids. Dazu wurden 10 µg Plasmid-DNA in einer 10fach konzentrierten Pufferlösung (Tab.2.2; entsprechend den Herstellerangaben Pufferlösung 2) mit 30 Einheiten des erforderlichen Restriktionsenzym *Nhe I* (*BioLabs*, New England, USA) in Aqua bidest 3 h bei 37°C inkubiert. Dann erfolgte eine Kontroll-Gelelektrophorese, um die Vollständigkeit des enzymatischen Verdaus zu überprüfen. Dazu wurden 2 µl des Linearisierungsansatzes mit 6fach-konzentrierter Pufferlösung (Tab.2.2) versetzt und auf ein nicht denaturierendes 0,8%iges Agarose-Gel mit 1 µl Ethidiumbromid aufgetragen (Laufzeit 1 h bei 80 Volt).

T7-Polymerase-Puffer <i>BioLabs, New England,</i> USA	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%	25 ml
	Bromophenolblaulösung	30 ml
	30% Glycerol	45 ml
	Aqua bidest	

Tab.2.2: Lösungen für die Linearisierung.

Phenol-Chloroform-Extraktion

Die restliche linearisierte DNA wurde mit Phenol und Chloroform aus dem Restriktionsansatz extrahiert. Dazu wurde jeweils ein Volumen Phenol und Chloroform zu dem Restriktionsansatz hinzugegeben. In der so entstehenden organischen Phase sollten sich Proteinreste auflösen, die entfernt werden sollten. Dazu wurde das Gemisch für 5 min (13000 rpm, 4°C, Biofuge fresco, Heraeus, Hanau) zentrifugiert, um anschließend die obere wässrige Phase, die die DNA enthielt, vorsichtig abzunehmen. Die organische Phase wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde mit Chloroform wiederholt. Dem verbleibenden Volumen der DNA (wässrige Phase) wurde dann 0,1 Volumen Na-Acetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol (100%, -20°C) zugegeben. Die anschließende Lagerung bei -20°C über Nacht führte aufgrund der hohen Salzkonzentration zur Fällung der DNA. Der Ansatz wurde für 30 min zentrifugiert (13000 rpm, 4°C), wobei sich die DNA als Pellet am Boden ablagerte. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde nochmal mit 500 µl Ethanol (70%, -20°C) gewaschen, erneut zentrifugiert (13000 rpm, 4°C) und dann für etwa 2 min in der speed-vac getrocknet. Die reine, linearisierte DNA wurde in 25 µl Wasser (DEPC-behandelt) aufgenommen. Mit 2 µl dieser Lösung wurde zur Kontrolle eine photometrische Konzentrationsbestimmung bei 260 nm durchgeführt.

Transkription in mRNA

Für die Transkription wurden 2-3 µg der linearisierten Matrize in 20 µl Wasser (DEPC-behandelt) aufgenommen. Das Fragment, das in mRNA umgeschrieben werden sollte, war in den Polylinker des pSGEM hinter die Promotorregion für die T7-RNA-Polymerase kloniert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C wurden dem Transkriptionsansatz (Tab.2.3) 15 µl ribonukleasefreie DNAse I (10 U/µl), *Roche*, Mannheim) zugegeben, wodurch die DNA-Matrize verdaut und die mRNA-Synthese beendet wurde.

Linearisierte DNA (2-3 µg)	20 µl	
ATP (10 mM)	5 µl	<i>Pharmacia Biotech</i> , Freiburg
GTP (10 mM)	5 µl	
CTP (10 mM)	5 µl	
UTP (10 mM)	5 µl	
m7G(5')Gppp(5')G (cap- Analogon) (10 mM)	5 µl	
Ribonuklease-Inhibitor (40U/µl)	2,5 µl	<i>Boehringer</i> , Mannheim
T7- Polymerase-Puffer (10fach)	6 µl	<i>BioLabs</i> , New England, USA
T7-RNA-Polymerase (20U/µl)	2,5 µl	<i>Boehringer</i> , Mannheim

Tabelle 2.3 : Transkriptionsansatz.

Es folgte erneut eine Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung über Nacht wie oben beschrieben. Nach Zentrifugation für 30 min wurde das Pellet mit 200 µl Ethanol (70%, 10°C) gewaschen und in der speed-vac getrocknet. Die gereinigte mRNA wurde schließlich in 10 µl Wasser (DEPC-behandelt) aufgenommen. Daraus wurde 1 µl für eine Kontroll-Gelelektrophorese (1,5%iges nicht denaturierendes Agarosegel, 1 µl Ethidiumbromid-Lösung, 80 V, 1 h) verwendet. Zur groben Abschätzung, in welcher Konzentration die synthetisierte mRNA vorlag, diente ein RNA-Marker als Vergleich. Dabei korreliert die Bandenschärfe mit der Qualität der RNA. Bis zur Injektion in *Xenopus* Oozyten wurde die RNA bei -80°C gelagert.

2.2 Elektrophysiologische Methoden

2.2.1 Salzlösungen

Alle Salzlösungen wurden bei 4°C gelagert und innerhalb 1 Woche verbraucht.

ND96-Lösung	
NaCl	96 mM
KCl	2 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 einstellen	

ND96-Oozytenaufbewahrungslösung	
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	1 mM
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	1 mM
Hepes	5 mM
Natriumpyruvat	2 mM
Gentamycin	100 µg/ml
mit 1 M NaOH auf pH 7,4 titrieren	

ND96-Lösung saures Milieu	
ND96-Lösung mit 1 M HCL auf pH 4,5 einstellen	

Kollagenase-Lösung	
Kollagenase Typ 1	25 mg
ND96- Lösung	10 ml

2.2.2 Stammlösungen der pharmakologischen Substanzen

Die Stammlösungen der pharmakologischen Substanzen wurden in Portionen bei -20°C gelagert. Für die Messungen benötigte Mengen der Stammlösungen wurden unmittelbar vor Beginn der Versuchsreihe aufgetaut und für die benötigten Konzentrationen in ND96-Lösung gelöst. Diese Lösungen wurden im Durchschnitt innerhalb von drei Stunden verbraucht.

Anandamid (<i>Sigma</i>)–Stammlösung (10 mM)	
25mg (MG 347,5)	in 7,0503 ml Ethanol

Arachidonsäure (<i>Sigma</i>)–Stammlösung (20 mM)	
50mg (MG 304,5)	in 8,128 ml Ethanol

WIN55,212-2 (<i>Tocris</i>)–Stammlösung (10 mM)	
10mg (MG 531,62)	in 1,881 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)

AM251 (<i>Sigma</i>)–Stammlösung (10 mM)	
10mg (MG 657,3)	in 1,494 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)

2.2.3 Vorbereitung der *Xenopus* Oozyten

Die im Durchmesser 1-1,5 mm großen Oozyten wurden einmal wöchentlich unter Narkose aus einem Afrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) herauspräpariert (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Würzburg; Prof. Koepsell und seine Arbeitsgruppe). Zum Bindegewebeabtau wurden die Oozyten für 2-3 h mit einer Kollagenase-Lösung behandelt. Danach wurden sie mit einer gekürzten und vorne rundgeschmolzenen Pasteurpipette sortiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C in einer ND96-Lösung mit Gentamycin (Oozytenaufbewahrungslösung).

Injektion von mRNA

Zur Herstellung geeigneter Injektionskanülen wurden dünnwandige Borosilikatglas-Kapillaren (3.5``Drummond # 3-000-203-G/X, *Schütt Labortechnik*, Würzburg) mit einem Mikropipetten- Puller (Micropipette Puller P-97, *Sutter Instrument Company*, Novato, USA) median erhitzt und ausgezogen. Mit einer Trabikularschere wurden die ausgezogenen Glasspitzen so gekappt, dass ihr Außendurchmesser ca. 10 µm

betrug. Die Herstellung dieser Injektionskanülen erfolgte jeweils unmittelbar vor der Injektion. Die fertigen Injektionskanülen wurden unter Verwendung einer Spritze (Kanüle 0,4 x 50mm) vom oberen Ende her mit etwa 4 μ l Paraffinöl (*Sigma*, Mineralöl, M8410) gefüllt und in einen in drei Ebenen beweglichen Mikromanipulator eingespannt. Mit diesem wurden dann unter mikroskopischer Sichtkontrolle durchschnittlich 1-2 μ l mRNA von einer Petrischale in die Injektionskanüle bei einer Umgebungstemperatur von etwa 22°C aufgesogen. Mithilfe der Pasteurpipette (s. o.) wurden Oozyten im Stadium V oder VI (Dascal, 1987) mit ND96-Lösung in eine Injektionskammer verbracht. Diese Injektionskammer besaß einen kammartigen Einsatz, der unter einem Binokular (Stereomikroskop SV-11, *ZEISS*, Oberkochen) eine Aneinanderreihung einzelner Oozyten ermöglichte. Mit einem vollautomatischen Nanoliterinjektor (*WPI*, Sarasota, USA) wurden pro Oozyte durchschnittlich 27,6-41,7 nl mRNA (je nach Verdünnungsgrad und Expressionsstärke des Transkripts) injiziert. Danach wurden die Oozyten in 24-well-Platten (*NUNC*, *NUNCLON*™, Cat.No. 143982) mit ND96-Lösung mit Gentamycin verteilt und über 1-3 Tage im Brutschrank bei 19°C inkubiert.

2.2.4 Methode der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC)

Die in dieser Arbeit untersuchten Ionenkanäle wurden mithilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (two-electrode-voltage clamp= TEVC) charakterisiert. Diese Technik wurde 1949 von Marmont, Cole und Hodgkin et al. entwickelt und von Hodgkin et al. (1952) verfeinert. Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ermöglicht die Ableitung des Stroms, der über die gesamte Zellmembran einer Zelle fließt. Dabei werden die unter Konstanthaltung der Membranspannung auftretenden Ionenströme gemessen.

Die Oozyte befindet sich gemeinsam mit einer Badelektrode in einer ND96-Lösung. Es werden nacheinander eine Spannungselektrode (V) und eine Stromelektrode (I) durch die Zellmembran gestochen (Abb.2.1).

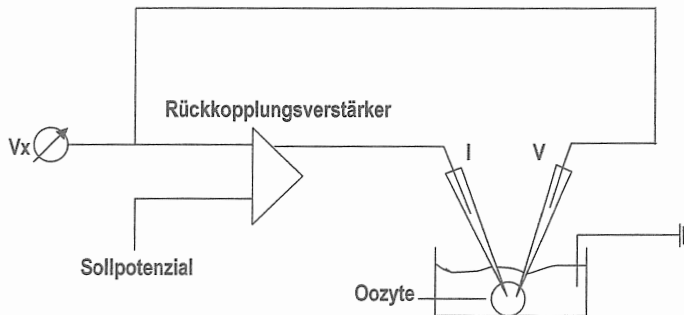


Abb. 2.1: Schema der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (mod. nach Wuttke, 2006).

V_x = Potenzial, I = Stromelektrode, V = Spannungselektrode

Die Elektroden sind mit einem Rückkopplungsverstärker verbunden, der das Membranpotenzial misst. Wenn man einen Sollwert für eine gewünschte Spannung vorgibt, vergleicht der Rückkopplungsverstärker das gemessene Membranpotenzial (V_m) mit dem Sollpotenzial (V_{soll}). Um das Sollpotenzial zu erreichen und konstant zu halten, produziert der Messverstärker einen Kompensationsstrom I_{comp} , der die gleiche Amplitude hat wie der über die Zellmembran fließende Strom I_m . Dieser Kompensationsstrom hat dabei aber die entgegengesetzte Polarität: $I_{comp} = -I_m$. Membranstrom und Kompensationsstrom heben sich also gegenseitig auf, so dass sich die Membranspannung nicht ändert („Spannungsklemme“).

Der Membranstrom ist als Folge von Ionenbewegungen über die Zellmembran bei bekanntem Potenzial zu interpretieren. Die Membranleitfähigkeit, die diesen Ionenbewegungen zugrunde liegt, hängt von Anzahl und Aktivität der in der Zellmembran vorhandenen Ionenkanäle ab. Daraus folgt, dass Änderungen der Membranleitfähigkeit Ausdruck einer veränderten Aktivität der Ionenkanäle sind.

2.2.5 Aufbau des Messstandes

In die Fokusebene eines inversen Mikroskops (Axiovert 35, ZEISS, Oberkochen, Deutschland) ist eine Messkammer montiert (Abb.2.2). Diese besteht aus nicht-leitendem Plexiglas und besitzt mittig eine Vertiefung zur Aufnahme der Oozyte. Über ein einfaches Perfusionssystem werden die Untersuchungslösungen in die

Messkammer geleitet und von einer hydraulischen Pumpe langsam wieder abgesaugt (s. auch 2.2.8).

Das Mikroskop ist auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert, was gemeinsam mit dem Faradaykäfig um den gesamten Messstand herum eine Abschirmung gegen mechanische und elektrische Einflüsse aus der Umgebung ermöglicht. Alle metallischen Gegenstände sind mit einem niederohmigen Kabel über eine Kupferplatte innerhalb des Faradaykäfigs geerdet.

Die Elektroden werden an Elektrodenhaltern zweier Mikromanipulatoren angebracht. Diese sind an zwei Säulen montiert, die wiederum auf dem schwingungsgedämpften Tisch befestigt sind. Auf diese Weise können die Elektroden unter mikroskopischer Sichtkontrolle in die Oozyte eingestochen werden. Der Messstand ist mit einem EPC9-gesteuerten voltage-clamp-Verstärker (*HEKA Elektronik*, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) und einem Pulsgenerator verbunden, der die Sollspannung generiert (vgl. 2.2.4). Alle Messungen werden von einem Computer digitalisiert und aufgezeichnet (s.2.2.7).

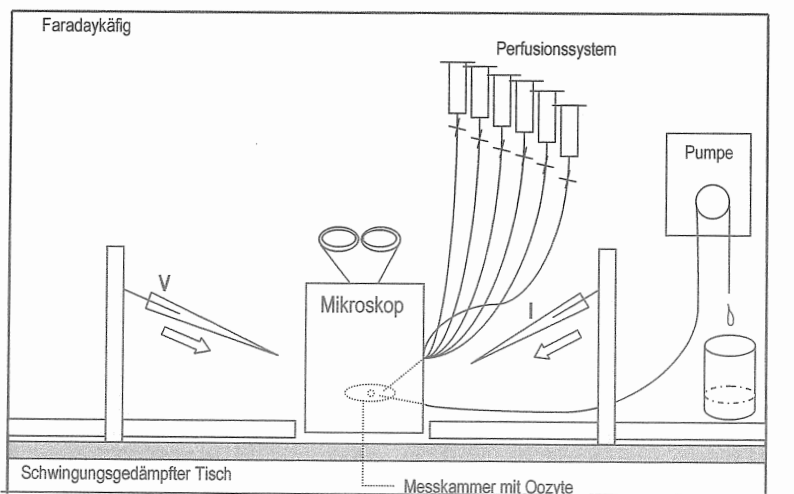


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Messstandes. V = Spannungselektrode, I = Stromelektrode

2.2.6 Herstellung der Ableitelektroden

Die Ableitelektroden setzen sich aus einem äußeren und einem inneren Anteil zusammen. Der äußere Anteil ist ein Glasröhrchen aus Borosilikat mit Filament (*HARVARD APARATUS*, Kent, UK; GC200F-15 = äußerer Anteil der Ableitelektrode). Dieses wird mithilfe eines Pullers (L/M-3P-A; *List Medical*, Darmstadt, Deutschland) ausgezogen. Dabei wird im ersten Schritt das Glasröhrchen senkrecht im Puller eingespannt, median bei ca. 20 A erhitzt und durch ein Gewicht am unteren Ende unter medianer Ausdünnung lang gezogen. Im zweiten Schritt erfolgt unter erneuter Erhitzung (ca. 15,5 A) eine mediane Spaltung in zwei Teile mit einem Spitzendurchmesser von ca. 1-3 μm .

Um das Einstechen in die Oozyten zu erleichtern, erfolgt eine Schärfung dieser Glaselektrode. Dazu wird ihre Spitze unter mikroskopischer Sichtkontrolle an einem gebogenen Draht vorsichtig abgebrochen. Die so präparierte Glaselektrode wird dann mit 3 M KCl luftblasenfrei befüllt.

Der innere Anteil der Ableitelektrode besteht aus einem chlorierten Silberdraht, der in den Elektrodenhalter des Messstandes eingespannt ist und über den nun die KCl-gefüllte Glaselektrode gestülpt wird. Jetzt kann der Widerstand der Ableitelektrode gemessen werden. Er sollte 0,5-2 M Ω nicht überschreiten. Um eine Verschmutzung der Glaselektroden zu vermeiden, wurden sie jeweils direkt vor dem Experiment hergestellt.

2.2.7 Messprotokolle

Zur Digitalisierung und Darstellung der Messdaten diente ein Power Macintosh G4 (*Apple Computer*, Cupertino, CA, USA). Als Software wurde *Pulse & Pulse fit* (*HEKA*) für die Herstellung der Messprotokolle eingesetzt. Es gilt die Konvention, den auswärtsgerichteten Strom mit positivem Vorzeichen, den einwärtsgerichteten Strom mit negativem Vorzeichen darzustellen.

Strom-Spannungskurven

Nach Einbringen der Ableitelektrode in die Oozyte wurde vor jedem Versuch ein Haltepotenzial von -60 mV erzeugt. Dieses liegt im physiologischen Bereich des Membranpotenzials der *Xenopus* Oozyten. Um zu überprüfen, ob und wie stark die Kaliumkanäle exprimiert werden, wurden Strom-Spannungskurven (IV-Kurven) ermittelt. Dabei wird das Haltepotenzial innerhalb von 2000 ms kontinuierlich von

-150 mV auf 60 mV angehoben, und der geflossene Strom gegen den jeweiligen Potenzialwert grafisch aufgetragen (Abb. 2.3). Charakteristisch für Kalium-Leckströme ist, dass sie sich bei symmetrischen K^+ -Konzentrationen beiderseits der Membran linear mit der Membranspannung verändern. Bei physiologisch niedrigen äußeren K^+ -Konzentrationen (z.B. 2 mM bzw. ND96-Lösung) lässt sich eine Gleichrichtung beobachten. Die Anwesenheit eines Kalium-Leckstroms lässt sich daher an der Zunahme des Auswärtsstroms (positives Vorzeichen) bei zunehmender Depolarisation ablesen. Dieses Stromverhalten lässt sich mit der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung treffend beschreiben.

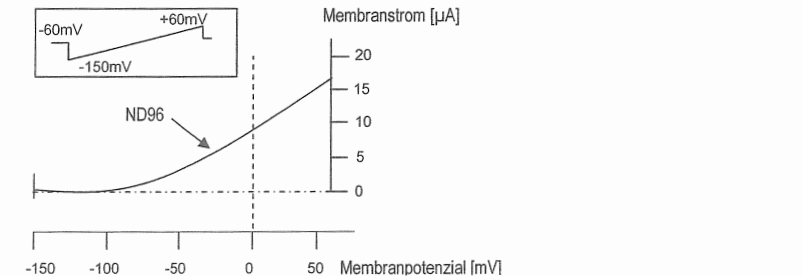


Abb.2.3:IV-Kurve eines auswärts gleichrichtenden Kalium-Kanals (TASK-1). Expressionssystem: Xenopus Oozyte. Der generierte Spannungspuls ist im Einsatzbild dargestellt. Die Strom-Spannungskurve zeigt den Stromfluss über die Zellmembran unter dem Einfluss reiner ND96-Lösung. Das Umkehrpotenzial (Nulldurchgang der Strom-Spannungskurve) befindet sich im Bereich des Kalium-Gleichgewichtspotenzials.

Repetitive Spannungssprünge

Um die Wirkungen der pharmakologischen Substanzen zu bestimmen, wurde folgende Konfiguration gewählt: Ausgehend von einem Haltepotenzial von -60 mV wurde die Spannung alle 3 sec auf $+30$ mV geklemmt und zwar für eine Dauer von 200 ms. Die in dieser Zeit unter Applikation der unterschiedlichen Substanzen über die Membran fließende Stromamplitude wurde gemessen und aufgezeichnet.

2.2.8 Applikation der Perfusionslösungen

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Um einen schnellen Austausch der extrazellulären Lösungen zu ermöglichen, wurde ein schnelles Perfusionsystem am Messplatz installiert (s. a. Abb. 2.2): Sechs 35 ml-Spritzen, die die Perfusionslösungen enthielten, wurden höhenverstellbar über der Messkammer angebracht. An jede Spritze wurde ein Drei-Wege-Hahn angebracht, so dass der Zulauf unmittelbar gestartet bzw. unterbrochen werden konnte. Die Spritzen waren mit der Messkammer über Polyethylen-Schläuche verbunden. Sie besaßen einen inneren Durchmesser von 0,1 mm und ermöglichten eine Fließgeschwindigkeit des Perfusats von 2–4 ml/min, je nachdem auf welcher Höhe die Spritzen angebracht waren. Dabei betrug der Abstand zwischen Perfusionszulauf und *Xenopus* Oozyte stets ca. 1 cm, um Veränderungen der Kanalaktivitäten durch mechanischen Membranstress zu vermeiden. Durch eine MPCU-3-Pumpe wurde an der Messkammerseite, die dem Perfusionszulauf gegenüber lag, kontinuierlich Lösung abgezogen, was eine annähernd laminare Strömung und einen Lösungsaustausch innerhalb der Kammer von < 3 sec ermöglichte.

Bei allen Experimenten mit 2PD-K⁺-Kanälen diente ND96-Lösung als Badlösung. Sie entspricht in ihrer Zusammensetzung etwa dem extrazellulären Milieu. Nach Applikation einer bestimmten Cannabinoid-Konzentration diente die Badlösung als Auswaschlösung.

2.3 Auswertung der Daten

2.3.1 Statistik

Alle gewonnenen Daten werden als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Um verschiedene Einflussgrößen (z.B. unterschiedliche endogene Ausstattung und Qualität der *Xenopus* Oozyten, Luftfeuchtigkeit, Materialermüdung etc.) zu berücksichtigen, wurde die Anzahl (n) der Experimente in jeder Versuchsreihe möglichst größer 10 gewählt. Es wurde der zweiseitige gepaarte t-Test nach Student mit $p < 0,01$ zur Prüfung der Signifikanz angewandt. Signifikante Änderungen werden im Text erwähnt.

2.3.2 Bestimmung der Dosis- Wirkungs- Beziehungen

Mit Hilfe der Software *IGOR Pro® Version 4.0 (WaveMetrics, Inc., Lake Oswego, OR, USA)* erfolgte die Auswertung der gewonnenen Daten. Dazu wurden zunächst alle arithmetischen Mittelwerte der Kanal-Aktivierung bzw. -Inhibition auf den jeweiligen Maximalwert mit $E_{\max} = 100\%$ (1,0) als gemeinsame Bezugsgröße normiert und in tabellarischer Form dem Software-Programm zugeführt. Hinsichtlich der Interaktion der Cannabinoide mit den untersuchten Proteinen wurde die klassische Rezeptortheorie zugrunde gelegt. Auf dieser Theorie beruht auch die Hill-Gleichung als logarithmische Funktion zur Ermittlung der Effektiv-Konzentration (EC_{50}) und der Steigung n_H (Hill-Koeffizient):

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

E_{\max}	Effekt bei maximaler Konzentration der Substanz
E_{\min}	Effekt bei minimaler Konzentration der Substanz
EC_{50}	Konzentration, bei der eine halb-maximale Aktivierung eintritt (IC_{50} bei Inhibition)
C	Konzentration der Substanz
n_H	Hill-Koeffizient

Für jede Wirksubstanz ergibt sich eine charakteristische Dosis-Wirkungs-Kurve, aus der sich im wesentlichen vier wichtige Aussagen hinsichtlich der

pharmakologischen Eigenschaften der eingesetzten Wirkstoffe ableiten lassen (Urban und Bleckwenn, (2002). Dazu gehören (a) die maximale Wirkungs-dosis, also die Dosis, bei der der stärkste Effekt erzielt werden kann, (b) die Potenz des Wirkstoffes, ausgedrückt durch die EC_{50} , (c) Aussagen über den wahrscheinlich zugrunde liegenden Wirkmechanismus, die aus der Kurvenform und ihrer Anstiegssteilheit (Hill-Koeffizient) abgelesen werden können und schließlich (d) die Streuungen, die die biologische Variabilität repräsentieren.

2.3.3 Graphische Darstellung

Mit der Software *IGOR Pro*[®] *Version 4.0* (*WaveMetrics, Inc., Lake Oswego, OR, USA*) wurden die Original- Ableitungen aus *Pulse & Pulse fit (HEKA)* bearbeitet und die Dosis-Wirkungs-Beziehungen grafisch dargestellt. Schematische Zeichnungen sowie Balkendiagramme wurden mit den Programmen *Word, Excel und Power Point (Microsoft-Office xp)* angefertigt.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von Cannabinoiden auf die Tandemporenkaliumkanäle TASK-1 und TASK-3

Zunächst wurden in der Spannungsklemme Kontrollversuche mit nicht-injizierten *Xenopus* Oozyten durchgeführt. Dabei hatten weder die Cannabinoide noch der Cannabinoid-Rezeptor-Antagonist AM251 (*Sigma*) eine Wirkung auf den Membranstrom. Anschließend wurden *Xenopus* Oozyten nach Injektion der Tandemporenkaliumkanäle TASK-1 bzw. TASK-3 elektrophysiologisch untersucht. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen der Wirkstoffe WIN55,212-2, Anandamid und Arachidonsäure appliziert und Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermittelt. Alle getesteten Wirkstoffe führten zu einer Verminderung des Stromflusses über die Oozytenmembran, was einer Aktivitätsabnahme der 2PD-K⁺-Kanäle entspricht. Der Cannabinoid-Rezeptor-Antagonist AM251 hatte auf die messbaren TASK-Ströme keinen Einfluß.

3.1.1 TASK-1 und Anandamid

Nach Injektion der TASK-1-mRNA wurden die *Xenopus* Oozyten 2-4 Tage lang inkubiert. In der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme konnte nach einem depolarisierendem Spannungspuls zu Beginn der Versuchsreihe ein Basis-Auswärtsstrom von im Durchschnitt etwa 7 µA gemessen werden. Die Applikation des Endocannabinoids Anandamid verursachte bereits bei einer Konzentration von 0,2 µM eine geringe Inhibition von 6,9% ± 4,4 (n=12, p<0,01) (Abb.3.1a). Die maximale Wirkung konnte bei einer Anandamidkonzentration von 10 µM beobachtet werden. Der gemessene Auswärtsstrom konnte bei dieser Konzentration durchschnittlich um 71,3% ± 9,7 (n=22, p<0,01) reduziert werden (Abb.3.1 b). Eine stärkere Inhibition konnte auch durch höhere Konzentrationen von Anandamid (30 µM, 50 µM) nicht mehr erreicht werden. Um pro Anandamidkonzentration die jeweils maximale Wirkung zu erreichen, war eine Applikationsdauer von etwa 60 s bei niedrigeren und 180 s bei höheren Anandamidkonzentrationen notwendig. Nach Beendigung der Anandamid-

Applikation wurde die Oozyte in der Messkammer mit ND96-Lösung umspült. Darunter stieg der inhibierte Strom wieder an und erreichte innerhalb von 30-80 s seinen Ausgangswert. Ab einer Applikation von 10 μM Anandamid verlängerten sich die Auswaschzeit und die Wiederanstiegsdauer des Stroms auf bis zu 600 s (Abb.3.1b). Aus der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem 2PD-K⁺-Kanal TASK-1 und dem Endocannabinoid Anandamid ergibt sich mittels Hill-Gleichung eine IC₅₀ von 1,95 μM und ein Hill-Koeffizient n_H von 1,42 (Abb.3.1c).

3.1.2 TASK-1 und WIN55,212-2

Das potente Aminoalkylindol WIN55,212-2 gilt als klassischer experimentell eingesetzter Cannabinoid-Rezeptor-Agonist. Auf den 2PD-K⁺-Kanal TASK-1 hatte er eine starke, dosisabhängige und reversible inhibitorische Wirkung. Die Perfusion mit einer WIN55,212-2-Lösung mit einer Konzentration von 0,1 μM verursachte im Durchschnitt eine Reduktion des gemessenen Stroms um 30,7% \pm 9,4 (n=11, p<0,01). Die maximale Wirkung konnte bei einer Konzentration von 3 μM verzeichnet werden. Dabei nahm der Membranstrom durchschnittlich um 81% \pm 6,8 (n=13, p<0,01) ab. Höhere Konzentrationen konnten die Wirkung von 3 μM WIN55,212-2 nicht übertreffen. Die Perfusionsdauer, die notwendig war, um die jeweils maximale Wirkung der einzelnen Konzentrationen zu erreichen, betrug etwa 30 s bei niedrigeren und 150 s bei höheren Konzentrationen. Die anfänglich rasch erfolgende Stromreduktion nahm vor dem Erreichen der maximalen Wirkung wieder ab, bis ein Plateau erreicht wurde. Die Auswaschzeit mit ND96-Lösung und die Wiederanstiegsdauer des Stroms nahmen nach höheren WIN55,212-2-Konzentrationen zu und betrugen bis zu 1800 s.

Aus der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem 2PD-K⁺-Kanal TASK-1 und dem synthetischen Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten WIN55,212-2 ergibt sich mittels Hill-Gleichung eine IC₅₀ von 0,83 μM und ein Hill-Koeffizient n_H von 1,65 (Abb.3.2).

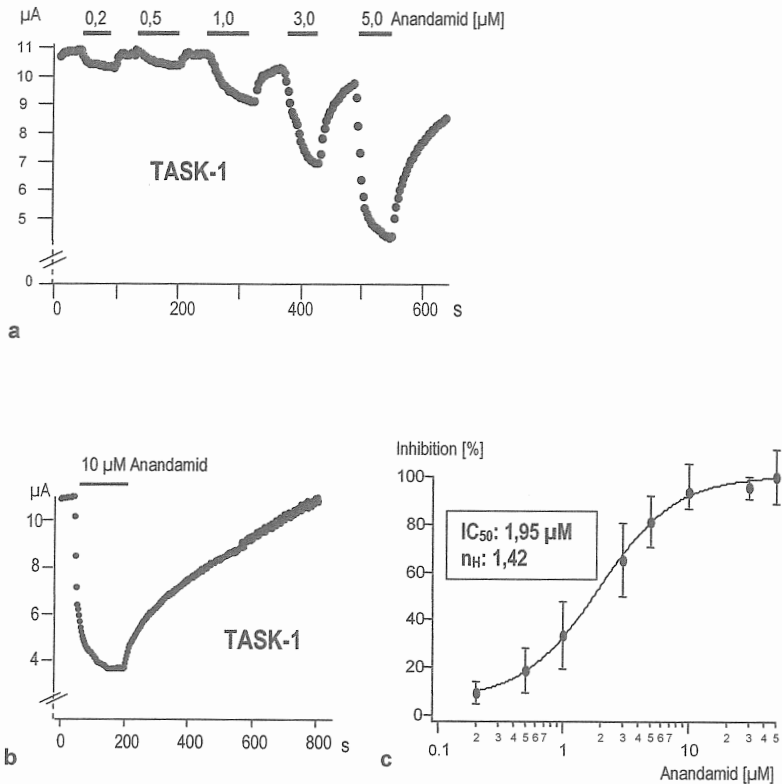


Abb.3.1: Dosis-Wirkung-Beziehung zwischen Anandamid und TASK-1. a: Ableitung mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme. Nach jeder einzelnen Applikation von Anandamid-Lösung wurde die Messkammer mit der Badlösung ND96 ausgewaschen, was einen Wiederanstieg des Stroms bewirkte. Die inhibitorische Wirkung von Anandamid ist offensichtlich dosisabhängig und reversibel. b: Ableitung mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme. Bei der Applikation von 10 μM Anandamid ließ sich die stärkste Inhibition beobachten. Nach einer Applikationsdauer von etwa 150 s sinkt der gemessene Strom um 85,7%. Nach Beendigung der Anandamid-Applikation ist eine Auswaschdauer von etwa 600 s notwendig, bis der Strom wieder seinen Ausgangswert erreicht. c: Es wurden acht verschiedene Konzentrationen Anandamid appliziert (0,2, 0,5, 1, 3, 5, 10, 30 und 50 μM), dabei war jeweils $n > 10$. Die ermittelten arithmetischen Mittelwerte wurden auf die maximale Inhibition (E_{max}) = 100% als gemeinsame Bezugsgröße normiert und als Funktion der logarithmisch dargestellten Anandamidkonzentrationen aufgetragen. Es ergibt sich eine IC_{50} von 1,95 μM und ein Hill-Koeffizient n_H von 1,42.

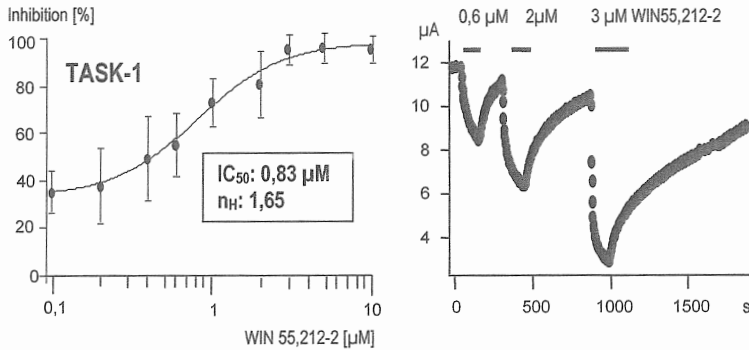


Abb.3.2: Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen TASK-1 und WIN55,212-2. Es wurden neun unterschiedliche Konzentrationen appliziert (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 1, 2, 3, 5 und 10 μM), dabei war jeweils $n > 10$. Die experimentell gewonnenen Mittelwerte wurden auf die maximale Inhibition (E_{max}) = 100% als gemeinsame Bezugsgröße normiert und als Funktion der logarithmisch dargestellten WIN55,212-2-Konzentrationen aufgetragen. Mit der Hill-Gleichung ergibt sich ein Hill-Koeffizient n_H von 1,65. Die Konzentration, die die halbmaximale Wirkung erzielte (IC_{50}) beträgt 0,83 μM .

3.1.3 TASK-1 und Arachidonsäure

Die vierfach ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure ist die Ausgangssubstanz der Eicosanoide und auch des Endocannabinoids Anandamid. Ihre Wirkung auf den Tandemporenkaliumkanal TASK-1 war inhibitorisch und reversibel. Nach Applikation einer 1 nM Arachidonsäure-Lösung konnte bereits eine leichte Hemmung des Membranstromes um $5,9\% \pm 4,2$ ($n=8$) beobachtet werden. Mit zunehmenden Konzentrationen nahm die inhibitorische Wirkung von Arachidonsäure zu. Die höchste eingesetzte Konzentration betrug 80 μM und rief eine Reduktion des Membranstromes um durchschnittlich $63,9\% \pm 11$ ($n=19$, $p < 0,01$) hervor (Abb.3.3a). Während der Perfusion mit verschiedenen Arachidonsäurekonzentrationen erreichte die Wirkung nach durchschnittlich 90 bis 200 s ein Plateau. Mit steigenden Konzentrationen nahmen auch die Auswaschphase und die Wiederanstiegsdauer des Stroms erheblich zu (bis auf 800 s nach Applikation einer Arachidonsäurekonzentration von 80 μM). Wie Abb.3.3b zu entnehmen ist, konnte keine Arachidonsäurekonzentration ermittelt

werden, deren Wirkung nicht mehr zu steigern war. Die höchste eingesetzte Konzentration betrug 80 μM . Die Berechnung der IC_{50} ergibt unter diesen Voraussetzungen eine Konzentration von 11,3 μM . Der Hill-Koeffizient n_H beträgt 0,9.

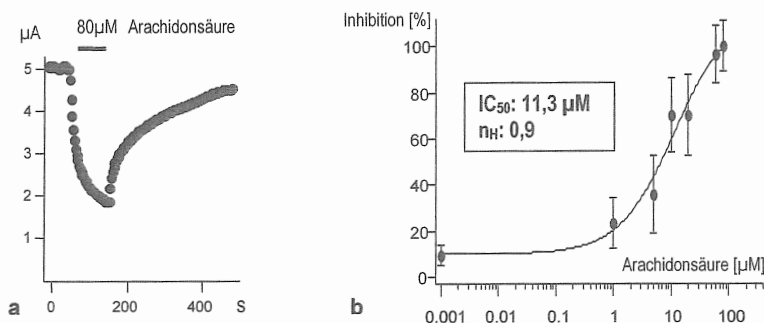


Abb.3.3:Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Arachidonsäure und TASK-1. a: Originalableitung. Die Applikation von 80 μM Arachidonsäure-Lösung bewirkte eine Reduktion des gemessenen Membranstroms um 66%. Nach Spülung mit ND96-Lösung stieg der Membranstrom langsam wieder an. b: Es wurden sieben unterschiedliche Konzentrationen appliziert (0,001, 1, 5, 10, 20, 60, 80 μM ; n jeweils > 8). Die experimentell gewonnenen Mittelwerte wurden auf die maximale Inhibition (E_{max}) = 100% als gemeinsame Bezugsgröße normiert und als Funktion der logarithmisch dargestellten Arachidonsäure-Konzentrationen aufgetragen. Die Konzentration, die die halbmaximale Wirkung erzielte (IC_{50}), beträgt 11,3 μM , während sich ein Hill-Koeffizient von 0,9 ergibt. Der Kurvenverlauf erreicht im Bereich der hohen Konzentrationen kein Plateau.

3.1.4 Wirkungen von Anandamid, WIN55,212-2 und Arachidonsäure auf den TASK-3

Versuche mit dem säure-sensitiven Tandemporenkaliumkanal TASK-3 wurden 1-2 Tage nach mRNA-Injektion in die Oozyten durchgeführt. Der in der Spannungsklemme gemessene Basisstrom betrug durchschnittlich 17 μA und wurde durch Spülung mit saurer ND96-Lösung (pH 4,5) nahezu vollständig gehemmt (Abb.3.4). Nach Applikation von einer 5 μM Anandamid-Lösung konnte eine reversible Reduktion des Basisstroms um 23,1% \pm 5,4 (n=5) beobachtet werden. Auch eine Konzentration von 50 μM erbrachte keine stärkere Inhibition (Abb.3.4). Eine maximale und reversible Inhibition durch Arachidonsäure ergab

sich bei einer Konzentration von 80 μM und betrug im Durchschnitt $20,3\% \pm 5,5$ ($n=5$) (Abb.3.4). Der synthetische Cannabinoid-Rezeptor-Agonist WIN55,212-2 erreichte in einer Konzentration von 10 μM eine maximale Inhibition von $32,4\% \pm 9,7$ ($n=4$) (nicht dokumentiert). Durch Spülung mit ND96-Lösung kehrte auch hier der gemessene Strom auf seinen Ausgangswert zurück. Da alle drei pharmakologischen Substanzen auf den TASK-3 eine deutlich schwächere Wirkung hatten als auf den TASK-1, wurde auf das Erstellen einer Dosis-Wirkungs-Beziehung verzichtet.

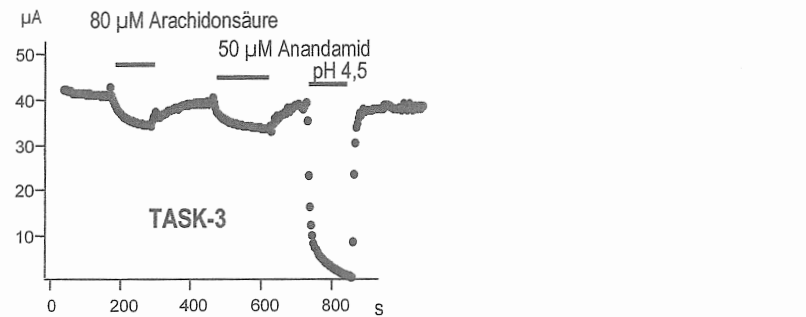


Abb.3.4: Wirkungen von Arachidonsäure, Anandamid und saurer ND96-Lösung auf den TASK-3. Die Perfusion mit Arachidonsäure in einer Konzentration von 80 μM bewirkte durchschnittlich eine reversible Reduktion des gemessenen Stromes um $20,3\% \pm 5,5$. Auch 50 μM Anandamid führten zu einer Inhibition um $21,4\% \pm 5$. Nach Applikation von saurer ND96-Lösung pH (4,5) wird der Auswärtsstrom charakteristischerweise nahezu vollständig gehemmt.

3.2 Wirkung von Cannabinoiden auf TASK-1-Mutanten

3.2.1 TASK-1 [$\Delta 243-248$]

Bei dieser Mutante wurden die sechs Aminosäuren Valin (V), Leucin (L), Arginin (R), Phenylalanin (F), Methionin (M) und Tyrosin (T) in Position 243-248 aus dem TASK-1-Protein entfernt (Abb.3.5a). Nach Injektion der mRNA und einer Inkubationszeit der Oozyten von 1-2 Tagen konnte ein Basisstrom von durchschnittlich 3 μA gemessen werden. Um die Funktionsfähigkeit der Deletionsmutante zu überprüfen, wurde der pH-Wert der ND96-Lösung von 7,4 auf

4,5 gesenkt. Dabei stellte sich die für die TASK-Kanäle typische reversible Inhibition des gemessenen Auswärtsstroms ein, was die Funktionsfähigkeit des Proteins bestätigte (Abb.3.5c). Die Perfusion mit 5 μM Anandamid-Lösung hatte im Gegensatz zum Wildtyp keine Auswirkung auf den gemessenen Auswärtsstrom (Abb.3.5b). Die Applikation 10 μM WIN55,212-2-Lösung bewirkte nur eine Reduktion des Auswärtsstroms um $26,4\% \pm 6,3$ ($n=4$) (Abb.3.5c).

Auch Arachidonsäure bewirkte im Vergleich zum Wildtyp nur eine geringe Inhibition. In einer Konzentration von 20 μM wurde eine Reduktion des Auswärtsstroms um $20,6\% \pm 5,1$ ($n=7$) gemessen (nicht dokumentiert). Dieser Effekt konnte von 80 μM Arachidonsäure nicht gesteigert werden.

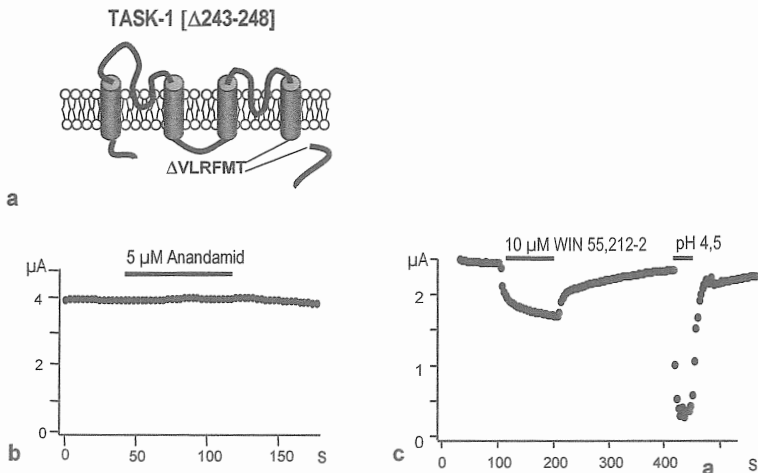


Abb.3.5: TASK-1 [$\Delta 243-248$]. a: Schematische Darstellung der Mutante mit Deletion von sechs Aminosäuren im Bereich des C-Terminus. b: Die Applikation von Anandamid in einer Konzentration von 5 μM ($n=17$) hatte keinerlei Wirkung auf die Deletionsmutante TASK-1 [$\Delta 243-248$]. c: Der Auswärtsstrom wird durch 10 μM WIN55,212-2 um $26,4\% \pm 6,3$ ($n=4$) reduziert. Die für die TASK-Kanäle typische pH-Sensitivität ist vollständig erhalten: Die Perfusion einer ND96-Lösung pH 4,5 führt zu einer typischen Reduktion des Auswärtsstromes.

3.2.2 TASK-1 [$\Delta 249-390$ RSSV]

Bei dieser TASK-1-Mutante wurden nach dem Sequenzmotiv VLRFMT an Position 243-248 die übrigen C-terminalen Aminosäuren mit Ausnahme der endständigen Aminosäuren RSSV entfernt. Diese Aminosäuren, die mit dem intrazellulären Protein 14-3-3 interagieren, sind Voraussetzung für einen gut funktionierenden Transport des Kanalproteins in die Zellmembran (Rajan et al., 2002) und wurden deshalb an das VLRFMT-Motiv angefügt (Abb.3.6b). Nach Injektion der mRNA in Oozyten und einer Bebrütungszeit von 2-3 Tagen konnte eine erfolgreiche Expression mit einem Basisauswärtsstrom von durchschnittlich 7 μ A verzeichnet werden. Die pH-Sensitivität war unverändert nachweisbar (nicht dokumentiert).

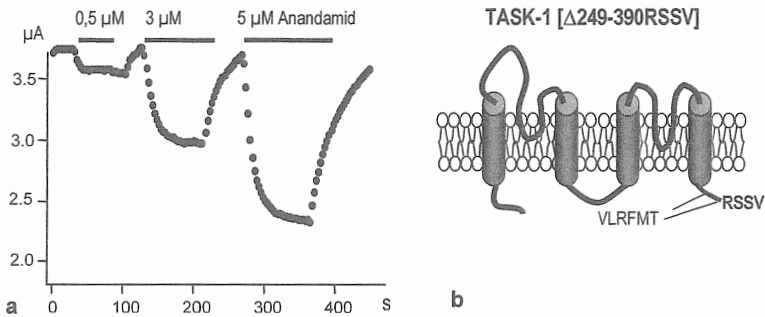


Abb.3.6: TASK-1 [$\Delta 249-390$ RSSV]. a: Originalableitung. Das Endocannabinoid Anandamid verursacht bei dieser Mutante genau wie beim Wildtyp eine konzentrationsabhängige und reversible Inhibition des gemessenen Auswärtsstroms. b: Schematische Darstellung des TASK-1 [$\Delta 249-390$ RSSV].

Wie den Daten aus Abb.3.6a zu entnehmen ist, verursachte Anandamid bei dieser Mutante ebenso wie beim Wildtyp eine konzentrationsabhängige Reduktion des messbaren Auswärtsstroms. Die maximale Inhibition wurde bei einer Anandamidkonzentration von 30 μ M erreicht und betrug $74,9\% \pm 8,7$ ($n=5$) (nicht dokumentiert). Dabei betrug die Applikationsdauer, die notwendig war, um den jeweils maximalen Effekt zu erzielen, zwischen 30 s (bei niedrigeren Konzentrationen) und 120 s (bei höheren Konzentrationen) und war damit kürzer als beim TASK-1 Wildtyp (60-180 s). Die Auswaschzeit und Wiederanstiegsdauer

des Stromes war mit ca. 30-300 s ebenfalls kürzer (30-600 s beim TASK-1 [Wildtyp]). Auch WIN55-212,2 und Arachidonsäure riefen beim TASK-1 [Δ 249-390RSSV] eine vergleichbare Inhibition des Auswärtsstroms wie beim TASK-1 [Wildtyp] hervor (Abb.3.7). Dabei reduzierte 10 μ M WIN55-212,2 den Strom um maximal 73,5% \pm 8,5 (n=9, p<0,01), während unter Applikation einer 80 μ M Arachidonsäure-Lösung eine Inhibition um 60,3% \pm 4,9 (n=7, p<0,01), nachgewiesen wurde (Abb.3.7) Auch bei WIN55,212-2 und Arachidonsäure war die notwendige Applikationsdauer der jeweiligen Konzentrationen sowie die Auswaschzeit und Wiederanstiegsdauer des Stromes kürzer als beim TASK-1 [Wildtyp].

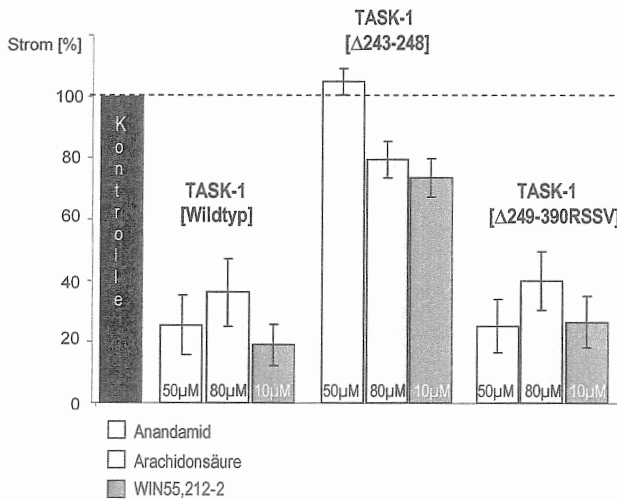


Abb.3.7: Maximale Wirkung von Cannabinoiden auf den TASK-1 [Wildtyp] und seine Mutanten. TASK-1 [Δ 243-248], dem das Motiv VLRFMT im C-Terminus fehlt, wird im Vergleich zum TASK-1 [Wildtyp] deutlich weniger durch Anandamid, Arachidonsäure und WIN55,212-2 inhibiert. Demgegenüber wird TASK-1 [Δ 249-390RSSV] durch Cannabinoide ähnlich inhibiert wie der TASK-1 [Wildtyp]. In die Säulen sind die Standardabweichungen und die jeweils eingesetzten Konzentrationen der Substanzen eingezeichnet.

3.3 Wirkung von Cannabinoiden auf TASK-3-Mutanten

3.3.1 TASK-3 [Δ 243-248]

Der Tandemporenkaliumkanal TASK-3 besitzt im C-Terminus die Sequenz VLRFLT (Aminosäuren 243-248), die mit Ausnahme von Leucin an Position 247 mit der Sequenz des TASK-1 identisch ist. Auch bei der Mutante TASK-3 [Δ 243-248] wurden diese sechs Aminosäuren entfernt (Abb.3.8b). Die elektrophysiologischen Messungen wurden zwei Tage nach Injektion der mRNA in Oozyten durchgeführt. Über der Oozytenmembran konnte ein Auswärtsstrom von durchschnittlich etwa 4,3 μ A gemessen werden und die pH-Sensitivität war vorhanden (Abb.3.8a). Anandamid bzw. Arachidonsäure in niedrigeren Konzentrationen verursachen bei dieser Mutante im Gegensatz zum Wildtyp keine Inhibition (nicht dokumentiert). Bei einer Konzentration von 10 μ M Anandamid bzw. 20 μ M Arachidonsäure konnte sogar eine Zunahme des Membranstroms um $25,0\% \pm 6,8$ ($n=10$, $p<0,01$) bzw. $36,3\% \pm 8,8$ ($n=10$, $p<0,01$) nachgewiesen werden (Abb.3.8a, 9). Unter der Applikation von 10 μ M WIN55,212-2 wurde eine geringere Inhibition ($17,4\% \pm 1,9$; $n=5$) als beim TASK-3 [Wildtyp] ($32,4\% \pm 9,7$) beobachtet.

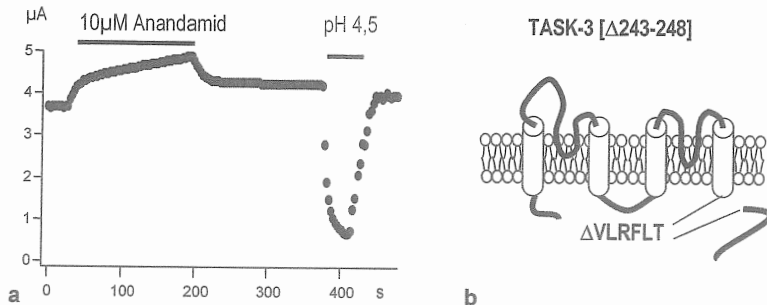


Abb.3.8: TASK-3 [Δ 243-248]. Originalableitung. **a:** 10 μ M Anandamid führen zu einer Zunahme des messbaren Stroms. Bei dieser Mutante ist die pH-Sensitivität ebenfalls erhalten, so dass der Auswärtsstrom unter Applikation von saurer ND96-Lösung (pH 4,5) reversibel inhibiert wird. **b:** Schematische Darstellung der Mutante TASK-3 [Δ 243-248].

3.3.2 TASK-3 [L247M]

Um die Bedeutung des Aminosäuremotivs an Position 243-248, das sich bei TASK-1 und TASK-3 nur durch eine Aminosäure unterscheidet, näher zu untersuchen, wurde bei TASK-3 das Leucin (L) an Position 247 gegen Methionin (M) ausgetauscht (TASK-3 [L247M]). Diese Mutante des TASK-3 besitzt also an Position 243-248 das gleiche Aminosäuremotiv wie der TASK-1.

Die elektrophysiologischen Messungen ergaben, dass die charakteristische pH-Sensitivität vorhanden war. Der gemessene Auswärtsstrom betrug im Durchschnitt $5 \mu\text{A}$ und wurde durch $5 \mu\text{M}$ Anandamid um durchschnittlich $19,1\% \pm 7,9$ ($n=4$) gesenkt. Höhere Konzentrationen hatten keinen weiteren Effekt. Unter Applikation von $10 \mu\text{M}$ WIN55,212-2 konnte eine Stromreduktion um durchschnittlich $39,3\% \pm 11,8$ ($n=5$) beobachtet werden. $20 \mu\text{M}$ Arachidonsäure reduzierten den Auswärtsstrom um $17,2\% \pm 2,4$ ($n=4$). Unter Spülung mit ND96-Lösung erreichte der Strom bei allen drei Substanzen wieder den Ausgangswert. Wie aus dem Säulendiagramm der Abb.3.9 ersichtlich, zeigen sich hinsichtlich der maximalen Wirkung der Cannabinoide keine Unterschiede zwischen dem TASK-3 [Wildtyp] und TASK-3 [L247M].

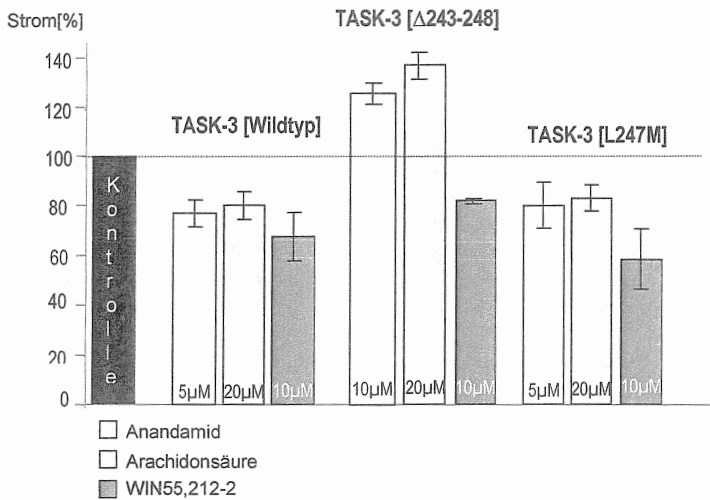


Abb.3.9: Wirkung von Cannabinoiden auf TASK-3 [Wildtyp], TASK-3 [Δ243-248] und TASK-3 [L247M]. Auf die Mutante TASK-3 [Δ243-248] hat nur WIN55,212-2 eine geringe inhibitorische Wirkung. Anandamid und Arachidonsäure führen hingegen zu einer Zunahme des Auswärtsstroms. Auf die Mutante TASK-3 [L247M] haben Cannabinoide keine andere Wirkung als auf den TASK-3 [Wildtyp].

4 Diskussion

Vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit der Modulation der Tandemporenkaliumkanäle TASK-1 und TASK-3 durch Cannabinoide. Beide Kanäle werden vor allem im ZNS exprimiert, wo sie in Neuronen eine wichtige Bedeutung für die Aufrechterhaltung des Ruhepotenzials durch einen auswärts gerichteten K^+ -Strom haben (Duprat et al., 1997; Medhurst et al., 2001; Chapman et. al., 2000; Rajan et al., 2000; Kim et al., 2000; Übersicht bei Patel und Lazdunski, 2004).

Um die pharmakologische Wirkung der in dieser Untersuchung verwendeten Cannabinoide (Anandamid, WIN55,212-2 und Arachidonsäure) genauer zu bestimmen, wurden Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermittelt, die u.a. Aussagen über die Wirksamkeit der eingesetzten Cannabinoide und deren Interaktionsweise mit den untersuchten Kanälen zulassen. Ein wesentliches Ergebnis ist, dass alle drei verwendeten Cannabinoide zu einer unterschiedlich starken und reversiblen Inhibition von TASK-1 und TASK-3 führen. Die Inhibition von TASK-3 ist dabei deutlich geringer als die von TASK-1, sodass die Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen TASK-3 und Cannabinoiden im Folgenden nicht weiter berücksichtigt werden sollen.

Darüber hinaus wurde untersucht, welche Auswirkungen C-terminale Mutationen dieser Kanalproteine auf die pharmakologische Wirkung der Cannabinoide haben. Diese Mutagenesestudien zeigen eindeutig, dass ein Motiv aus 6 Aminosäuren essentiell für die Interaktion der Cannabinoide mit den Tandemporenkaliumkanälen ist.

Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen TASK-1 und Anandamid, WIN55,212-2 und Arachidonsäure

Alle drei Cannabinoide inhibieren reversibel TASK-1, jedoch ist das Ausmaß der Inhibition unterschiedlich. Der synthetisch hergestellte Cannabinoid-Rezeptor-Agonist WIN55,212-2 ergab im Vergleich zu Anandamid und Arachidonsäure die eindeutig potenteste Inhibition, was durch eine IC_{50} von $0,83 \mu M$ zum Ausdruck kommt. Mit einer IC_{50} von $1,92 \mu M$ folgt Anandamid, während Arachidonsäure mit einer IC_{50} von $11,3 \mu M$ als sehr schwach wirksam einzustufen ist. Eine maximale Reduktion des Stromflusses durch die Oozytenmembran, nämlich um 81%, wurde

ebenfalls mit WIN55,212-2 nachgewiesen, während sich eine geringere maximale Reduktion bei Anwendung von Anandamid (ca. 71%) und Arachidonsäure (ca. 64%) ergab. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass WIN55,212-2 nicht nur ein potenter Cannabis-Rezeptor-Agonist (Pacheco et al., 1991) sondern auch ein sehr wirksamer Ligand für den TASK-1 ist.

Eine direkte Wirkung der Cannabinoide Anandamid, Methanandamid und WIN55,212-2 wurde bereits an transfizierten COS-7-Zellen nachgewiesen, wobei die IC_{50} für Methanandamid $0,7 \mu\text{M}$ betrug (Maingret et al., 2001). Die IC -Werte für Anandamid und WIN55,212-2 wurden von den Autoren jedoch nicht ermittelt. Sie fanden lediglich eine deutliche, jedoch geringere Inhibition von TASK-1 durch WIN55,212-2 als bei Verwendung von Anandamid. Im Gegensatz dazu war in unserem Expressionssystem (*Xenopus* Oozyten) die Wirkung von WIN55,212-2 am stärksten (IC_{50} von $0,83 \mu\text{M}$), was den Ergebnissen mit Methanandamid entspricht (Maingret et al., 2001). Während in unserem Expressionssystem eindeutige Arachidonsäureeffekte nachweisbar waren, hatte dieses Cannabinoid keine Wirkung auf den in COS-7-Zellen exprimierten TASK-1 (Maingret et al., 2001). Maingret et al. (2001) wiesen auch nach, dass der inhibitorische Effekt an TASK-1 direkt und nicht über Cannabinoid-Rezeptoren ausgelöst wird. Ein direkter Effekt dürfte auch bei den von uns verwendeten *Xenopus* Oozyten vorliegen, da diese keine endogenen Cannabinoid-Rezeptoren besitzen. Direkte, Rezeptor unabhängige Effekte des Cannabinoids Anandamid wurden auch für weitere Kanäle nachgewiesen, u.a. K_v -Kaliumkanäle (Poling et al., 1996), VR1-Kationen-Kanäle (Smart und Jerman, 2000) und T-Typ Calciumkanäle (Chemin et al., 2001). Bei den untersuchten Tandemporenkaliumkanälen handelt es sich um Dimere (Lopes et al., 2001; Karschin et al., 2001; Goldstein et al., 2005), also um Proteine aus zwei Untereinheiten (s. Einleitung). Biochemisch tritt bei Proteinen aus zwei oder mehreren Untereinheiten häufig Kooperativität auf, d. h. dass die Affinität zwischen Ligand und Rezeptor abhängig ist von der Anzahl der bereits gebundenen Liganden. Nimmt die Bindungswahrscheinlichkeit mit der Anzahl der bereits gebundenen Liganden zu, spricht man von positiver Kooperativität, nimmt die Bindungswahrscheinlichkeit ab, spricht man von negativer Kooperativität.

Zur Ermittlung einer positiven oder negativen Kooperativität wird die Hill-Gleichung verwendet, bei der es sich um eine erweiterte Michaelis-Menten-Gleichung

handelt. Der hierbei als Exponent ermittelte Hill-Koeffizient (n_H) ist ein Maß für die Kooperativität. Ist der Hill-Koeffizient <1 , liegt negative Kooperativität vor, ist er >1 , liegt positive Kooperativität vor. Die Anwendung der Hill-Gleichung auf die von uns ermittelten Dosis-Wirkungs-Beziehungen führte zu unterschiedlichen Hill-Koeffizienten. So ergab sich für WIN55,212-2 und Anandamid mit $n_H=1,65$ bzw. $1,42$ eine positive Kooperativität mit TASK-1. Dies steht in Einklang mit der sigmoiden Form der Dosis-Wirkungs-Kurven, d.h. dass ab einer bestimmten Konzentration dieser Cannabinoide eine nicht weiter steigerbare Inhibition vorliegt. Ein sigmoider Kurvenverlauf wurde auch für die Interaktion zwischen dem Cannabinoid Methanandamid und TASK-1 in COS-7-Zellen gezeigt (Maingret et al., 2001).

Anders verhält es sich mit Arachidonsäure. Der Hill-Koeffizient ist bei Verwendung dieser Substanz $n_H=0,9$. Es liegt somit keine Kooperativität vor. Dies kommt auch durch die Form der Dosis-Wirkungs-Kurve zum Ausdruck. Sie ist nicht sigmoid und mit zunehmender Konzentration von Arachidonsäure nimmt auch die inhibitorische Wirkung weiter zu, d.h. dass keine Konzentration ermittelt werden konnte, die nicht zu einer weiteren Inhibition geführt hätte. Diese Befunde sprechen möglicherweise gegen die Annahme, dass die inhibitorische Wirkung von Arachidonsäure als Ausgangssubstanz von Anandamid dadurch zustande kommt, dass Arachidonsäure an der Oozytenmembran oder intrazellulär in Anandamid selbst umgewandelt wird. Andererseits könnte der zelluläre Umsatz von Arachidonsäure zu Anandamid ein limitierender Faktor sein und die nicht sigmoide Form der Dosis-Wirkungs-Kurve erklären.

Funktionelle Bedeutung der C-terminalen Aminosäuren 243-248 von TASK-1 und TASK-3

Talley und Bayliss (2002) wiesen nach, dass bei den Tandemporenkaliumkanälen TASK-1 und TASK-3 eine Sequenz von sechs C-terminalen Aminosäuren (Aminosäuren 243-248) für die aktivierende Wirkung des Inhalationsanästhetikums Halothan und für die inhibierende Wirkung des Neuropeptids TRH (Thyreotropin Releasing Hormon) notwendig ist.

Sie entfernten in Mutationsstudien bei beiden Kanälen den restlichen C-Terminus nach Position 248. Bei diesen C-terminal trunkierten Kanälen blieben die

Wirkungen von Halothan und TRH erhalten, d.h. dass der gesamte restliche C-Terminus ab Position 249 keine Bedeutung für die Wirkungen von Halothan und TRH hat. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass hier mehrere Motive lokalisiert sind, die mit der Weiterleitung Rezeptor vermittelter Signale assoziiert sind, wie Motive für die Phosphorylierung durch Proteinkinase A und Proteinkinase C und auch für die Phosphorylierung von Tyrosin (Duprat et al., 1997; Talley und Bayliss, 2002).

Außerdem konnten Talley und Bayliss (2002) zeigen, dass der Ersatz der sechs Aminosäuren in Position 243-248 bei TASK-1 und auch TASK-3 durch die korrespondierenden Aminosäuren des Tandemporenkaliumkanals TREK-1 zu einer Aufhebung der Halothan- und TRH-Wirkung führte. TREK-1 besitzt in der Position 243-248 die Aminosäuresequenz GDWLRV, die keine Homologie mit der Sequenz der Tandemporenkaliumkanäle TASK-1 bzw. TASK-3 in dieser Position (VLRFMT bzw. VLRFLT) aufweist. Daraus wurde geschlossen, dass die C-terminalen Aminosäuren 243-248 von TASK-1 und TASK-3 die Halothan-sensitive Sequenz darstellen.

Ausgehend von diesen Befunden sollte in vorliegender Untersuchung herausgefunden werden, ob auch die Wirkung von Cannabinoiden auf die Tandemporenkaliumkanäle TASK-1 und TASK-3 durch die C-terminalen Aminosäuren 243-248 vermittelt wird. Die Mutante TASK-1 [Δ 243-248], der die sechs C-terminalen Aminosäuren fehlen, ist durch die Cannabinoide Arachidonsäure und WIN55,212-2 deutlich geringer inhibierbar als beim TASK-1 [Wildtyp]. Die hemmende Wirkung von Anandamid war sogar vollständig aufgehoben. Auch beim TASK-3 [Δ 243-248] führt das Fehlen dieser sechs Aminosäuren zu deutlich veränderten Wirkungen der Cannabinoide. Unter dem Einfluss von Anandamid und Arachidonsäure konnten keine hemmenden, sondern vielmehr sogar aktivierende Wirkungen nachgewiesen werden, auch ist die inhibitorische Wirkung von WIN55,212-2 geringer als beim TASK-3 [Wildtyp].

Bei einer weiteren Mutante von TASK-1 [Δ 249-390RSSV] wurden nach dem Sequenzmotiv VLRFMT (Position 243-248) die übrigen C-terminalen Aminosäuren mit Ausnahme der endständigen Aminosäuren RSSV entfernt. Diese Aminosäuren, die mit dem intrazellulären Protein 14-3-3 interagieren, sind Voraussetzung für einen gut funktionierenden Transport des Kanalproteins in die Zellmembran (Rajan

et al., 2002) und wurden deshalb an das VLRFMT-Motiv angefügt. Die Wirkungen von Anandamid, Arachidonsäure und WIN55,212-2 zeigten bei dieser Mutante keinen Unterschied zum TASK-1 [Wildtyp]. Es konnte aber beobachtet werden, dass die Perfusionsdauer bis zum Erreichen der jeweiligen Wirkungen kürzer war als beim TASK-1 [Wildtyp]. Auch der Wiederanstieg des gemessenen Membranstroms unter Auswaschen mit ND96-Lösung erfolgte bei dieser Mutante schneller als beim TASK-1 [Wildtyp]. Dies könnte u.a. dafür sprechen, dass durch die C-terminale Verkürzung von TASK-1 der Zugang zu dem für die Wirkung relevanten Proteinabschnitts verbessert wird. Andererseits könnte die Verkürzung auch zu einer Beschleunigung der Liganden vermittelten Konformationsänderung von TASK-1 und damit zu einer Effektivitätssteigerung der Cannabinoide führen.

Bei einer ähnlichen TASK-1-Deletionsmutante, bei der der gesamte C-Terminus ab Aminosäure 249 entfernt wurde (TA 248), also auch die Aminosäuren RSSV (s.o.), wurde ebenfalls eine unveränderte Inhibition von TASK-1 festgestellt, wobei weitere Einzelheiten nicht beschrieben wurden (Maingret et al., 2001).

Das Motiv aus 6 Aminosäuren in Position 243-248 bei TASK-1 (VLRFMT) und TASK-3 (VLRFLT) unterscheidet sich nur durch eine Aminosäure in Position 247, nämlich Leucin (L) bei TASK-3 und Methionin (M) bei TASK 1. Um festzustellen, ob dieser Aminosäureunterschied für die geringere Sensitivität von TASK-3 gegenüber Cannabinoiden verantwortlich ist, wurde mittels einer Punktmutation bei TASK-3 Leucin (L) gegen Methionin (M) ausgetauscht (TASK-3 [L247M]). Diese Mutante des TASK-3 besitzt also an Position 243-248 die gleiche Aminosäuresequenz wie TASK-1. Die Mutante TASK-3 [L247M] besitzt im Vergleich zum TASK-3 [Wildtyp] keine höhere Sensitivität gegenüber den untersuchten Cannabinoiden. Dies spricht dafür, dass nicht allein die Aminosäuresequenz 243-248 für die geringe Cannabinoidsensitivität von TASK-3 verantwortlich ist.

Die für die TASK-Kanäle typische Sensitivität gegenüber extrazellulärer Azidose (Duprat et al., 1997; Leonoudakis et al., 1998, Kim et al., 1999;) war auch bei allen in dieser Arbeit verwendeten Mutanten nachweisbar. Sowohl beim TASK-1 (Lopes, et al., 2001) als auch beim TASK-3 (Rajan et al.; 2000) konnte gezeigt werden, dass der Histidin-Rest His-98 am äußeren Teil der Pore (angrenzend an den K⁺-Selektivitätsfilter) für die Azidose-Sensitivität verantwortlich ist. Die Erhaltung der

Azidose-Sensitivität bei den von uns verwendeten Mutanten war zu erwarten, da die Mutationen weit entfernt von His-98 erfolgten, belegt jedoch, dass der Gatingmechanismus des Kanalproteins nicht prinzipiell beeinträchtigt war.

Schlußfolgerungen

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass vor allem TASK-1 durch alle verwendeten Cannabinoide rezeptorunabhängig und unterschiedlich stark gehemmt wird. Diese Hemmung ist reversibel. Für die direkte Bindung dürfte das C-terminale Aminosäuremotiv 243-248 der Tandemporenkaliumkanäle TASK-1 (und TASK-3) von entscheidender Bedeutung sein. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass sowohl das Neuropeptid TRH und das Inhalationsanästhetikum Halothan (Talley und Bayliss, 2002) als auch die Cannabinoide die gleiche Bindungsstelle teilen. Vielmehr ist anzunehmen, dass die Aminosäuresequenz in Position 243-248 für eine mögliche Konformationsänderung der Proteine im Rahmen der Interaktion mit den genannten Substanzen eine Schlüsselrolle spielt.

Eine Inhibition der in verschiedenen Zellsystemen exprimierten TASK-1 und TASK-3 durch Cannabinoide könnte auch für die *in vivo*-Wirkung von größerer physiologischer Bedeutung sein, da einige *in vivo*-Wirkungen der Cannabinoide nicht durch Cannabinoid-Rezeptoren vermittelt werden (Adams et al., 1998; Di Marzo et al., 2000; Monory et al., 2002). Die hierfür notwendige Freisetzung von endogenen Cannabinoiden in Form von Anandamid wurde im ZNS nachgewiesen (Giuffrida et al., 1999). Die intravenöse Gabe von Anandamid unterdrückt bei Mäusen CB₁-Rezeptor unabhängig Spontanaktivitäten und führt zu Hypothermie, Analgesie und Immobilität (Adams et al., 1998). Eine ähnliche Anandamidwirkung wurde auch an Cannabinoid-Rezeptor (CB₁-defizienten) Knockout-Mäusen gefunden (Di Marzo et al., 2000). Es ist daher in Betracht zu ziehen, dass Anandamid nicht nur an CB₁-Rezeptoren bindet und über diese bestimmte Wirkungen entfaltet. So wurde eine Interaktion von Anandamid mit Serotonin-, Glutamat/NMDA- und Acetylcholin-Rezeptoren nachgewiesen (Hampson et al., 1998; Kimura et al., 1998; Lagalwar et al., 1999). Nicht auszuschließen ist auch das Vorkommen bisher noch nicht nachgewiesener G-Protein gekoppelter Cannabinoid-Rezeptoren (Di Marzo et al., 2000), die die CB₁-Rezeptor unabhängigen Wirkungen von Anandamid bei Mäusen (s.o.) erklären könnten.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung der ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure, des Endocannabinoids Anandamid und des synthetischen Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten WIN55,212-2 auf die Tandemporenkaliumkanäle TASK-1 und TASK-3 untersucht. Dazu wurden an *Xenopus* Oozyten, denen die entsprechende Kanal-RNA injiziert wurde, in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme elektrophysiologische Messungen durchgeführt.

Zunächst wurden für alle drei Substanzen Dosis-Wirkungs-Beziehungen bestimmt. Diese führten zu folgenden Ergebnissen:

- TASK-1 wird durch WIN55,212-2 um bis zu ca. 81% gehemmt. Die IC_{50} beträgt 0,83 μ M. Anandamid besitzt eine IC_{50} von 1,92 μ M und hemmt den Strom um bis zu ca. 71%. Bei WIN55,212-2 bzw. bei Anandamid liegt mit einem Hill-Koeffizienten (n_H) von 1,65 bzw. von 1,42 positive Kooperativität vor. Arachidonsäure hingegen inhibiert den Strom nur um bis zu ca. 63%. Die IC_{50} beträgt 11,3 μ M. Der Hill-Koeffizient von 0,9 ergibt negative Kooperativität.
- TASK-3 wird durch alle drei Substanzen deutlich weniger inhibiert. Die maximale Inhibition durch WIN55,212-2 [10 μ M] beträgt 32,4% (\pm 9,7). Fünf μ M Anandamid bzw. 80 μ M Arachidonsäure verursachen eine Hemmung um 32,1% (\pm 5,4) bzw. um 20,3% (\pm 5,5).

Bei beiden Kanalproteinen wurde außerdem untersucht, welche Bedeutung den Aminosäuren in Position 243-248, die bei TASK-1 und TASK-3 mit Ausnahme einer Aminosäure übereinstimmen, bei der Wirkung von Cannabinoiden zukommt. Dazu wurden Mutationsstudien im Bereich des C-Terminus von TASK-1 und TASK-3 durchgeführt.

- Es wurden die sechs Aminosäuren in Position 243-248 aus TASK-1 bzw. TASK-3 entfernt (TASK-1 [Δ 243-248] bzw. TASK-3 [Δ 243-248]). Die inhibitorische Wirkung von WIN55,212-, Anandamid und Arachidonsäure war bei TASK-1 [Δ 243-248] deutlich vermindert, während es bei TASK-3 [Δ 243-248] zu unterschiedlichen Effekten kam.
- Der gesamte C-Terminus des TASK-1 wurde entfernt, mit Ausnahme der sechs Aminosäuren in Position 243-248. Außerdem wurden die

endständigen Aminosäuren RSSV an das Restprotein angefügt, da diese für einen gut funktionierenden Transport in die Membran notwendig sind (TASK-1 [Δ 249-390RSSV]). Die Wirkungen von WIN55,212-2, Anandamid und Arachidonsäure entsprachen bei dieser Mutante denen, die beim TASK-1 [Wildtyp] beobachtet wurden.

- Durch Punktmutation wurde beim TASK-3 Leucin an Position 247 durch Methionin ersetzt (TASK-3 [L247M]). Diese Mutante besitzt dadurch in Position 243-248 das gleiche Sequenzmotiv wie der TASK-1. Im Vergleich zum TASK-3 [Wildtyp] waren die Wirkungen der Cannabinoide bei dieser Mutante jedoch unverändert.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die untersuchten Cannabinoide eine rezeptorunabhängige, spezifische und reversible inhibitorische Wirkung auf die Tandemporenkaliumkanäle TASK-1 und TASK-3 haben. Die Aminosäuren in Position 243-248 sind für diese Wirkung der Cannabinoide von wesentlicher Bedeutung.

6 Literaturverzeichnis

- Adams IB, Compton DR, Martin BR** (1998): Assessment of anandamide interaction with the cannabinoid brain receptor: SR 141716A antagonism studies in mice and autoradiographic analysis of receptor binding in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 284(3):1209-17
- Aller MI, Veale EL, Linden AM, Sandu C, Schwaninger M, Evans LJ, Korpi ER, Mathie A, Wisden W and Brickley SG** (2005): Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 25(49):11455–11467
- Chapman CG, Meadows HJ, Godden RJ, Campbell DA, Duckworth M, Kelsell RE, Murdock PR, Randall AD, Rennie GI, Gloger IS** (2000): Cloning, localisation and functional expression of a novel human, cerebellum specific, two pore domain potassium channel. *Brain Res Mol Brain Res* 82(1-2):74-83
- Chemin J, Monteil A, Perez-Reyes E, Nargeot J and Lory P** (2001): Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J* 20(24):7033-40
- Cole, KS** (1949): Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Arch Sci Physiol* 3 253-258
- Dascal N** (1987): The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem* 22:317-87
- Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR** (1988): Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34(5), 605-13
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, and Mechoulam R** (1992): Isolation and structure

of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (Wash DC)* 258:1946–1949

Di Marzo V, Breivogel CS, Tao Q, Bridgen DT, Razdan RK, Zimmer AM, Zimmer A, Martin BR (2000): Levels, Metabolism, and Pharmacological Activity of Anandamide in CB1 Cannabinoid Receptor Knockout Mice: Evidence for Non-CB1, Non-CB2 Receptor-Mediated Actions of Anandamide in Mouse Brain. *J Neurochem* 75, 2434–2444

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.

Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J (1996): Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett* 393, 231-35

Gaffal E (2003): Einfluss von Cannabinoiden und Opioiden auf die Aktivität der glatten Muskelzelle im Magenfundus und Ileum der Ratte. München, Univ. Diss., Identifikationsnummer: 969622899 (http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=969622899&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=969622899.pdf)

Gaoni Y and Mechoulam R (1964): Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 86, 1646-47

Gessa GL, Mascia MS, Casu MA (1997): Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR 141716A. *Eur J Pharmacol* 327(1):R1-2

Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, O'Rourke ST (2006): Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* 110(1):103-16. Review.

- Gifford AN and Ashby CR** (1996): Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN55212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist, SR 141716A. *J Pharmacol Exp Ther* 277(3) 1431-6
- Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D** (1999): Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 2(4):358-63
- Goldstein SAN., 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 SAN, Bayliss DA, Kim D, Lesage F, Plant LD, Rajan S** (2005): International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev* 57: 527-540.
- Gutman, G.A. et al.** (2003): International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: Potassium channels. *Pharmacol Rev* 55:583-586.
- Hampson AJ, Bornheim LM, Scanziani M, Yost CS, Gray AT, Hansen BM, Leonoudakis DJ, Bickler PE** (1998): Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J Neurochem* 70(2):671-6
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR** (1991): Characterization and localisation of the cannabinoid receptors in the rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11, 563-83
- Hodgkin A L., Huxley AF and Katz M** (1949): Ionic current underlying activity in the giant axon of the squid. *Arch Sci Physiol* 3 129-150

- Hodgkin A, Huxley A, Katz B** (1952): Measurements of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116: 424-48
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG** (2002): International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacol Rev* 54:161-202
- Ishac EJ, Jiang L, Lake KD** (1996): Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol* 118(8), 2023-8
- Kang D, Han J, Talley EM, Bayliss DA, Kim D** (2004): Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells. *J Physiol* January 1; 554(Pt 1): 64-77
- 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, Rajan S, Derst C, Grzeschik KH, Daut J und Andreas 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. *Mol Cell Neurosci* 18: 632-648
- Kim Y, Bang H und Kim D** (1999): TBAK-1 and TASK-1, two-pore K⁺-channel subunits: kinetic properties and expression in rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277: H1669-H1678
- Kim Y, Bang H, Kim D** (2000): TASK-3, a new member of the tandem pore K(+) channel family. *J Biol Chem* 275(13):9340-7

- Kimura T, Ohta T, Watanabe K, Yoshimura H, Yamamoto I (1998):** Anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, also interacts with 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor. *Biol Pharm Bull* 21(3):224-6
- Lagalwar S, Bordayo EZ, Hoffmann KL, Fawcett JR, Frey WH 2nd (1999):** Anandamides inhibit binding to the muscarinic acetylcholine receptor. *J Mol Neurosci* 13(1-2):55-61
- Leonoudakis D, Gray AT, Winegar BD, Kindler CH, Harada M, Taylor DM, Chavez RA, Forsayeth JR und Yost CS (1998):** An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum. *J Neurosci* 18: 868-877
- Lesage F, Reyes R, Fink M, Heurteaux C, Lazdunski M (1996):** Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfid bridge. *EMBO J* 15: 6400-6407
- Lesage F and Lazdunski M (2000):** Molecular and functional properties of two-pore- domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F793-F801
- Liman Er, Tytgat J, Hess P (1992):** Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9: 861-71
- Lopes CM, Zilberberg N, Goldstein SA (2001):** Block of Kcnk3 by protons. Evidence that 2-P-domain potassium channel subunits function as homodimers. *J Biol Chem* 276, 24449-24452
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992):** Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48(3), 655-68
- Maingret F, Patel A, Lazdunski M, Honoré E (2001):** The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K⁺ channel TASK-1. *EMBO J* 20 (1-2):47-54

- Marmont, G** (1949): Studies on the axon membrane. I. A new method. *J Cell Comp Physiol* 34 351-382
- Medhurst AD, Rennie G, Chapman CG, Meadows H, Duckworth MD, Kelsell RE, Gloger II, Pangalos MN** (2001): Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res Mol Brain Res* 86(1-2):101-114
- Matsuda L, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI** (1990): Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-564
- Meera P, Wallner M, Song M, Toro L** (1997) Large conductance voltage- and calcium-dependent K^+ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14066-14071
- Monory K, Tzavara ET, Lexime J, Ledent C, Parmentier M, Borsodi A, Hanoune J** (2002): Novel, not adenylyl cyclase-coupled cannabinoid binding site in cerebellum of mice. *Biochem Biophys Res Commun* 292(1):231-5
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M** (1993): Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61-65
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M** (2001): Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbh Stuttgart*
- O'Connell AD, Morton MJ, Hunter M** (2002): Two-pore domain K^+ channels – molecular sensors. *Biochim Biophys Acta* 1566:152-161

- Pacheco M, Childers SR, Arnold R, Casiano F, Ward SJ** (1991): Aminoalkylindoles: actions on specific G-protein-linked receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 257(1), 170-83
- Patel AJ and Honoré E** (2001a): Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺- Channels. *Trends in Neurosci* 24:339–346 No.6
- Patel AJ and Honoré E** (2001b): Anesthetic- sensitive 2P Domain K⁺ Channels. *Anesthesiology* 95:1013-21 No. 4
- Patel AJ and Lazdunski M** (2004): The 2P-domain K⁺ channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Pflugers Arch* 448(3):261-73
- Pertwee RG** (1997): Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Pharmacol Ther* 74:129-180
- Pertwee RG** (1999): Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Current medicinal chemistry* Aug;6(8):635-64
- Pertwee RG** (2001): Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol* 63(5):569-611
- Piomelli D** (2003): The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* Nov;4(11):873-84. Review
- Poling JS, Rogawski MA, Salem N Jr, Vicini S** (1996): Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits Shaker-related voltage-gated K⁺ channels. *Neuropharmacology* 35(7):983-91
- QIAGEN** Plasmid Midi and Maxi Protocol (7/1999). *Plasmid Purification Handbook*
- Rajan S, Wischmeyer E, Liu GX, 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, Preisig-Müller R, Wischmeyer E, Nehring R, Hanlexy PJ, 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.
- 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.
- Shen M, Piser TM, Seybold VS** (1996): Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci* 16 (14):4322-34
- Shuck ME, Piser TM, Bock JH, Jerry L, Slightom JL, Lee KS und Bienkowski MJ** (1997): Cloning and Characterization of Two K⁺ Inward Rectifier (K_{ir}) 1.1 Potassium Channel Homologs from Human Kidney (K_{ir}1.2 and K_{ir}1.3). *J Biol Chem* 272(1):586-93
- Silbernagl und Despopoulos** (2001): Taschenatlas der Physiologie. 5. Auflage, Thieme
- Smart D, Jerman JC** (2000): Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 21(4):134
- Talley EM, Solòrzano G, Lei Q, Kim D, Bayliss DA** (2001): CNS distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci* 21(19): 7491-7505.
- Talley EM and Bayliss DA** (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 EM, Sirois JE, Lei Q, Bayliss DA (2003): Two- Pore- Domain (KNCK) Potassium Channels: Dynamic Roles in Neuronal Funktion. *The Neuroscientist* 9(1):46-56

Urban BW, Bleckwenn M (2002): Concepts and correlations relevant to general anaesthesia. *Br J Anaesth* 89(1): 3-16

Wuttke TV (2006): Charakterisierung des molekularen Wirkmechanismus des neuen Antikonvulsivums Retigabin am KCNQ2 Kaliumkanal. Ulm, Univ., Diss., (http://vts.uni-ulm.de/docs/2007/5859/vts_5859_7823.pdf)

Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI (1999): Increased mortality, hypoactivity an hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 5780-5785

Danksagung

Ich danke allen, die mich bei der Vorbereitung und Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich möchte mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Andreas Karschin für die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Erhard Wischmeyer, der mich den Umgang mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme gelehrt hat und den Fortgang meiner Arbeit durch seine motivierenden Diskussionen und seine Hilfsbereitschaft ermöglichte.

Herrn Dr. Volker Schmidt, Frau Dr. Elke Wischmeyer und Herrn Dr. Frank Döring danke ich für die Einführung in molekularbiologische Methoden, ihre freundliche Unterstützung und ihre zahlreichen Anregungen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Tanja Martini, Frau Heike Lorenz, Frau Maria Oppmann und Frau Brigitte Trost bedanken, die mich zuverlässig im Laboralltag unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Herrn Prof. Dr. Herrmann Koepsell und seinen Mitarbeitern am Anatomischen Institut der Universität Würzburg danke ich herzlich für die freundliche Bereitstellung von *Xenopus* Oozyten.

Insbesondere möchte ich mich auch bei Frau Dr. Katharina Oehrlein bedanken, die mir als medizinische Doktorandin mit Rat und Tat zur Seite stand und eine effiziente Teamarbeit ermöglichte.