

Zellfreie Synthese und elektrophysiologische Charakterisierung von TREK K2P Kanälen

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

vorgelegt von Marianne Musinszki

Kiel, 2019

Erster Gutachter: Prof. Dr. Thomas Baukrowitz

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Eric Beitz

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 2019

Zusammenfassung

Kaliumkanäle sind mit fast 80 Genen die größte Ionenkanalklasse im menschlichen Genom und ermöglichen grundlegende physiologische Prozesse wie neuronale Erregung, Muskelkontraktion und Sekretionsvorgänge. Die Kaliumkanal-Überfamilie der Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle (K2P-Kanäle) zeichnet sich durch eine extrazelluläre Kappe und vier Transmembranhelices mit zwei Porendomänen im Tandem aus, so dass zur Bildung der tetrasymmetrischen kaliumselektiven Pore nur zwei Untereinheiten erforderlich sind. K2P-Kanäle werden durch viele physiologische Stimuli wie pH, Lipide, Temperatur oder Phosphorylierung moduliert, so dass sie extra- und intrazelluläre Signalwege in Zellen integrieren können. Sie wurden in nativen Zellen und heterologen Expressionssystemen durch die *Patch-Clamp*-Technik untersucht, allerdings können wichtige Fragestellungen z.B. der Lipidregulation besonders gut unter Ausschaltung zellulärer Umgebung an Kanälen in künstlichen Membranen adressiert werden. Die rekombinante Herstellung humaner K2P-Kanäle gelang jedoch bisher nur nach Trunkierung der zytoplasmatischen N- und C-Termini. Die Einzelkanaleigenschaften solcher Kanäle waren verändert und C-terminal vermittelte Regulationsmechanismen sind nicht untersuchbar. Daher wurde in dieser Arbeit die zellfreie Expression als Herstellungsmöglichkeit vollständiger K2P-Kanäle und deren elektrophysiologische Charakterisierung in einer künstlichen Membran definierter Zusammensetzung etabliert. Verschiedene zellfreie Systeme wurden auf ihre Fähigkeit getestet, K2P-Protein zu synthetisieren. Die Herstellung war im Weizenkeimextrakt und mit geringerer Ausbeute auch im nicht-kommerziellen Tabakzellextrakt erfolgreich. GFP-Fusionsproteine wurden als geeignete Faltungsindikatoren für K2P-Kanäle identifiziert und die Synthese im Weizenkeimextrakt optimiert. Die Translationsreaktion wurde in Anwesenheit verschiedener unilamellarer Liposomen durchgeführt, in die K2P-Kanäle direkt insertierten. Die Membranlokalisation wurde in Liposomen durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Die Kanäle zeigten eine präferentielle Orientierung in der liposomalen Membran, die eine kotranslationale Insertion impliziert. Die Funktionalität von TREK-Kanälen wurde elektrophysiologisch in Liposomen und planaren künstlichen Membranen gezeigt. Schließlich wurden *hTREK 2*- und *hTREK2*-GFP-Kanäle in vertikalen künstlichen Membranen charakterisiert. *hTREK 2*-Einzelkanäle zeigten eine einwärts gleichrichtende Strom-Spannungs-Beziehung und Leitwerte von 106 pS bei -40 mV und 69 pS bei $+40$ mV. Dies entsprach den für Wildtypkanäle beschriebenen Eigenschaften. Die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle in der künstlichen Membran war mit 0,5 sehr hoch und deutete auf eine Destabilisierung des weniger aktiven *down*-Zustands durch das verzweigte Lipid DPhPC hin. Die zellfreie Synthese von K2P-Kanälen und deren Charakterisierung in künstlichen Membranen eröffnet die Möglichkeit, in Zukunft offene Fragen insbesondere der Lipidregulation unter definierten Bedingungen zu untersuchen.

Summary

Potassium channels comprise about 80 genes in the human genome and constitute the largest class of ion channels. They enable basic physiological processes like neuronal action potential generation, muscle contraction and secretory processes. The superfamily of Two-Pore Domain (K2P) potassium channels feature an extracellular cap structure and four transmembrane helices with two pore domains in tandem. Therefore only two subunits combine to form the fourfold symmetry of the potassium selective pore. K2P channels are modulated by many physiological stimuli such as pH, lipids, temperature or phosphorylation, thus integrating extra- and intracellular signalling pathways. K2P channels have been characterised in native cells and heterologous expression systems by the Patch-Clamp technique. However, important problems like regulation by lipids can be explored particularly well in the absence of cellular environment in artificial membranes. Recombinant protein production of human K2P channels was so far only feasible after truncation of cytoplasmic N- and C-termini. Single channel properties of truncated channels were altered, and regulation mechanisms effective at the carboxyterminus cannot be studied. Hence, this thesis establishes cell-free expression as an alternative scheme for production of full-length K2P channels and their electrophysiological characterisation in artificial membranes of known composition. Several cell-free systems were screened for their ability to produce K2P channel protein. Synthesis was successful in wheat germ extract and –with lower yields– in the non-commercial tobacco cell lysate. GFP fusion proteins were identified as suitable folding indicators for K2P channels and synthesis conditions in the promising wheat germ extract were optimised. The translation reaction was performed in presence of different unilamellar liposomes, into which K2P channels were directly incorporated. Membrane localisation in liposomes was assessed by confocal fluorescence microscopy. The channels showed a preferential orientation in the liposomal membrane that indicated a cotranslational insertion mechanism. The function of TREK K2P channels was demonstrated by electrophysiological means in liposomes and planar artificial membranes. Finally, single *hTREK2*- and *hTREK2*-GFP channels were electrophysiologically characterised in vertical artificial membranes. Single *hTREK2* channels showed an inwardly rectifying current-voltage relationship and a single channel conductance of 106 pS at -40 mV and 69 pS at $+40$ mV. This is consistent with single channel characteristics reported for wildtype channels. The open probability of *hTREK2* channels in artificial membranes was as high as 0.5 and indicated a destabilisation of the low activity 'down' state by the branched Lipid DPhPC. Cell-free synthesis of K2P channels can thus provide an opportunity to further investigate open questions, particularly of lipid regulation, in a well-defined environment.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Die Familie der K2P-Kanäle	2
1.2	Zellfreie Expression	16
2	Material und Methoden	20
2.1	Molekularbiologische Methoden	20
2.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
2.1.2	Subklonierung	22
2.1.3	Transformation und Anzucht von <i>E. coli</i> sowie Plasmidpräparation	24
2.1.4	<i>In-vitro</i> -Transkription	25
2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese	25
2.1.6	Reinigung von Nukleinsäuren	26
2.1.7	Kultur und Transfektion von HEK 293-Zellen	26
2.2	Biochemische Methoden	27
2.2.1	Reinigung, Fällung, Konzentrationsbestimmung & Trennung von Proteinen	27
2.2.2	Proteinfärbungen	28
2.2.3	Immundetektion von Proteinen (<i>Western Blot</i>)	29
2.2.4	Herstellung und Verwendung von Liposomen und Proteoliposomen	30
2.3	Zellfreie Expression	32
2.3.1	Zellfreie Expression im <i>E. coli</i> -Extrakt	32
2.3.2	Zellfreie Expression im BY 2-Tabakzelleextrakt	34
2.3.3	Zellfreie Expression im Weizenkeimextrakt	35
2.4	Fluoreszenzmethoden	36
2.4.1	Quantifizierung der GFP-Gesamtfluoreszenz	36
2.4.2	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	36
2.4.3	Fluoreszenzdetektion im SDS-Polyacrylamidgel	37
2.5	Elektrophysiologische Methoden	38
2.5.1	Messungen an <i>Xenopus-laevis</i> -Oocyten	38
2.5.2	<i>Patch-Clamp</i> -Messungen an GUV und unilamellaren Blasen	41
2.5.3	Messungen an planaren künstlichen Membranen	41
2.5.4	Messungen an vertikalen künstlichen Membranen	43
2.6	Datenbanken und Programme	46
3	Ergebnisse	48
3.1	Herstellung der K2P-Konstrukte und Testung der GFP-Fusionsproteine	48
3.2	Die GFP-Fusion verändert nicht die Eigenschaften von <i>hTREK2</i> -GFP- Kanälen	50
3.2.1	<i>rTREK1</i> -GFP-Kanäle sind sowohl in <i>Xenopus-laevis</i> -Oocyten als auch in HEK 293-Zellen an der Plasmamembran lokalisiert	51
3.2.2	<i>hTREK2</i> -GFP bildet einen funktionellen Kaliumkanal	52
3.2.3	<i>hTREK2</i> - und <i>hTREK2</i> -GFP-Kanäle sind durch extrazellulären pH, Rutheniumrot und 2-APB modulierbar	52
3.3	Zellfreie Expression von K2P-Kanälen in verschiedenen Systemen	55
3.3.1	Das bakterielle zellfreie System eignet sich nicht zur Produktion von K2P-Kanälen	55

3.3.2	Die Herstellung von K2P-Kanälen ist im Tabakzellextrakt möglich	56
3.3.3	Die zellfreie Synthese von K2P-Kanälen im Weizenkeimextrakt ist erfolgreich	58
3.4	Optimierungen der K2P-Synthese im Weizenkeimextrakt	64
3.4.1	Zusatz von Detergenzien	64
3.4.2	Zeitverlauf, Temperaturpräferenz und Nachgabe von Reaktionsbestandteilen in der zellfreien Expression	64
3.4.3	Zusatz von großen unilamellaren Vesikeln (GUV)	65
3.4.4	GUV erlauben Beobachtung und Abschätzung der Orientierung von K2P-Kanälen	66
3.5	Untersuchung von zellfrei synthetisierten <i>r</i> TREK1-GFP- Einzelkanälen in GUV durch verschiedene elektrophysiologische Methoden	69
3.6	Elektrophysiologische Messung von zellfrei synthetisierten <i>h</i> TREK2- und <i>h</i> TREK2-GFP-Einzelkanälen in SUV	71
3.6.1	Zusatz von kleinen unilamellaren Vesikeln (SUV)	71
3.6.2	Elektrophysiologische Messung von <i>h</i> TREK2- und <i>h</i> TREK2-GFP-Proteoliposomen in planaren künstlichen Membranen	73
3.6.3	Elektrophysiologische Messung von <i>h</i> TREK2- und <i>h</i> TREK2-GFP-Proteoliposomen in vertikalen künstlichen Membranen	75
4	Diskussion	82
4.1	Charakterisierung der GFP-Fusionsproteine als geeignete Fluoreszenzmarkierung für Zwei-Porendomänen-Kaliumkanal (K2P)-Kanäle	82
4.2	Wahl des zellfreien Systems und Expression von K2P-Kanälen im Weizenkeimextrakt	83
4.3	Insertion von zellfrei hergestellten K2P-Kanälen in Liposomen und Orientierung von <i>r</i> TREK1-Kanälen in der große unilamellare Vesikel (GUV)-Membran	84
4.4	Die fehlende N-Glykosylierung beeinträchtigt nicht die Herstellung funktioneller TREK-Kanäle	89
4.5	Biophysikalische Eigenschaften von TREK-Kanälen	90
4.6	Mechanistische Implikationen für das Lipid-Schaltmodell	93
4.7	Zusammenfassung und Ausblick	97
	Literatur	II
	Danksagung	XVIII
	Eidesstattliche Erklärung	XIX

Abbildungen

1	Unterteilung und Verwandtschaft der K2P-Familie und Signaturmotive von K2P-Kanälen	2
2	Aufbau der K2P-Kanäle und Regulationsmechanismen von TREK-Kanälen	5
3	Struktur der K2P-Kanäle.	7
4	Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren	23
5	Konfiguration des konfokalen Mikroskops für Fluoreszenzaufnahmen . .	37
6	<i>hTREK2</i> - und <i>hTREK2</i> -GFP-Ströme gemessen an <i>Xenopus</i> -Oocyten . .	40
7	Aufbau von Apertur und vertikaler künstlicher Membran	44
8	Aufbau der Konstrukte für die zellfreien Synthesen und die Expression in HEK 293-Zellen	50
9	Membranfluoreszenz von <i>rTREK1</i> -GFP-Fusionsproteinen in <i>Xenopus-laevis</i> -Oocyten und Zellkulturzellen einer Nierenzelllinie (HEK 293)-Zellen	51
10	<i>hTREK2</i> - und <i>hTREK2</i> -GFP-Ströme gemessen an <i>Xenopus-laevis</i> -Oocyten	52
11	Ansäuerung aktiviert TREK2- und TREK2-GFP-Kanäle gleichermaßen	53
12	Rutheniumrot blockiert <i>hTREK2</i> - und <i>hTREK2</i> -GFP-Kanäle	54
13	2-APB-Aktivierung von <i>hTREK2</i> - und <i>hTREK2</i> -GFP-Kanälen	55
14	Nach zellfreier Reaktion im E. coli-Extrakt ist keine Synthese fluoreszierender K2P-Proteine nachweisbar	56
15	<i>hTREK2</i> -GFP-Protein wird im Tabakzellextrakt synthetisiert	57
16	Im Weizenkeimextrakt lassen sich K2P-Kanäle zellfrei synthetisieren . .	58
17	<i>rTREK1</i> - und <i>hTREK2</i> -Kanäle entstehen in voller Länge	59
18	GFP-Fusionen machen den Anteil korrekt gefalteter <i>rTREK1</i> -GFP-Kanäle sichtbar	60
19	Vergleich der relativen Fluoreszenzausbeute in den drei untersuchten Extrakten	61
20	Übersicht über Versuche zur Produktion funktioneller K2P-Kanäle . . .	62
21	Zeitverlauf, Temperaturpräferenz und Nachgabe von Reaktionsbestandteilen der zellfreien Synthese im Weizenkeimextrakt	65
22	GUV-Zusatz verbessert die Ausbeute der zellfreien Synthese von K2P-Kanälen im Weizenkeimextrakt	66
23	<i>rTREK1</i> -GFP-Kanäle insertieren in die GUV-Membran	67
24	In GUV ist der Carboxyterminus von <i>rTREK1</i> -GFP-Kanälen überwiegend nach außen orientiert	68
25	Aufbau der Systeme für planare (horizontale) <i>Bilayer</i>	69
26	<i>Patch-Clamp</i> -Versuchsaufbau	70
27	<i>rTREK1</i> -GFP-Einzelkanalstrom im GUV	70
28	Anreicherung von Proteoliposomen durch diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation	72
29	Einzelkanalmessungen von <i>rTREK1</i> -GFP in planaren künstlichen Membranen	74
30	Versuchsaufbau für Experimente an vertikalen künstlichen Membranen .	75
31	Einzelkanalmessungen von <i>hTREK2</i> - und <i>hTREK2</i> -GFP-Kanälen im vertikalen <i>Bilayer</i>	76
32	Histogramme der Einzelkanalmessungen von <i>hTREK2</i> -Kanälen	78
33	Histogramme der Einzelkanalmessungen von <i>hTREK2</i> -GFP-Kanälen . .	79

34	Strom-Spannungs-Beziehungen, Leitwerte und Offenwahrscheinlichkeiten der Einzelkanalmessungen von <i>hTREK2</i> - und <i>hTREK2</i> -GFP-Kanälen .	80
35	Acyllketten in den Fenestrierungen von <i>hTRAAK</i> - und <i>hTREK2</i> -Kanälen und Modell zur Stabilisierung des <i>down</i> -Zustandes	95

Tabellen

1	Übersicht der in der <i>Protein Data Bank</i> bis Januar 2019 abgelegten Kristallstrukturen von K2P-Kanälen	10
2	Übersicht und Sequenzen verwendeter Primer	21
3	Übersicht verwendeter Antikörper	30
4	Zusammensetzung der Synthesereaktion im <i>E. coli</i> -Extrakt	34
6	Zusammensetzung der Synthesereaktionen im Tabakzellextrakt.	35
8	Zusammensetzung der Synthesereaktionen im Weizenkeimextrakt	36
10	Lösungen zur Oocytenpräparation und -lagerung	38
12	Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten kodierenden Sequenzen und ihrer Proteinprodukte	49

Abkürzungen

2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat	15
APS	Ammoniumperoxodisulfat	28
ATP	Adenosintriphosphat	1
ADP	Adenosindiphosphat	
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion (engl. <i>attenuated total reflectance</i>)	
BK	Slo 1-Kaliumkanal (engl. <i>big conductance K⁺</i>)	
BSA	bovines Serumalbumin	20
CMV	Cytomegalievirus	24
COS 7	immortalisierte Nierenzelllinie aus der afrikanischen Grünen Meerkatze (engl. <i>CV-1 in Origin, carrying SV40</i>)	
CTP	Cytidintriphosphat	
cRNS	kodierende RNS mit 5'-7-Methylguanosin-Kappe, 5'- β -Globin-Teilsequenz und Polyadenylierung (engl. <i>coding</i>)	25
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	
DDM	n-Dodecyl- β -maltosid	27
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	
dH₂O	deionisiertes Wasser	29
ddH₂O	Reinstwasser (engl. <i>double distilled</i>)	20
DMSO	Dimethylsulfoxid	39
DNS	Desoxyribonukleinsäure	16
dNTP	Desoxyribonukleotid	
DPhPC	1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	30
DRG	Spinalganglien (engl. <i>dorsal root ganglion</i>)	80
DTT	Dithiothreit	25
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	
EC₅₀	exzitatorische halbmaximale Konzentration	40
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>ethylenediamintetraacetic acid</i>)	25
ER	Endoplasmatisches Retikulum	18
<i>g</i>	Erdbeschleunigung	
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	
GTP	Guanosintriphosphat	
GUV	große unilamellare Vesikel (engl. <i>giant unilamellar vesicles</i>)	4
HA	Proteinmarkierungssequenz aus Hämagglutinin (Position 98-106, YPYDVPDYA)	
HEK 293	Zellkulturzellen einer Nierenzelllinie (engl. <i>human embryonic kidney</i>)	5
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	25
<i>hERG</i>	K _v 11.1-Kaliumkanal (engl. <i>human ether-a-gogo-related gene</i>)	1
IMAC	Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Ni ²⁺ (engl. <i>immobilized metal affinity chromatography</i>)	27
K2P	Zwei-Porendomänen-Kaliumkanal	4

KcsA	Kaliumkanal aus <i>Streptomyces lividans</i>	
LB	Luria-Bertani	24
MCS	Polyklonierungsstelle (engl. <i>multiple cloning site</i>).....	22
MscL	Mechanosensitiver Ionenkanal aus <i>E. coli</i> (engl. <i>Large-conductance mechanosensitive ion channel</i>)	
MscS	Mechanosensitiver Ionenkanal aus <i>E. coli</i> (engl. <i>Small-conductance mechanosensitive ion channel</i>)	
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>) ..	17
PBS	phosphatgepufferte NaCl-Lösung (engl. <i>Phosphate buffered saline</i>)...	26
PC	Phosphatidylcholin	30
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)	3
PE	Phosphatidylethanolamin	30
PI	Phosphatidylinositol	30
PIP₂	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat	3
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholin	95
PTFE	Polytetrafluorethylen	42
PVDF	Polyvinylidenfluorid	29
RCK	regulatorische Untereinheit oder Domäne einiger Kaliumkanäle (engl. <i>regulators of K⁺ conductance</i>).....	2
RNS	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>).....	16
RNase	RNS spaltendes Enzym	
RNAP	RNS-Polymerase (engl. <i>ribonucleic acid polymerase</i>)	
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)	28
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	28
SP6	Bakteriophage SP6	22
SUV	kleine unilamellare Vesikel (engl. <i>small unilamellar vesicles</i>).....	27
T7	Bakteriophage T7.....	25
TALK	engl. <i>TWIK-related alkaline pH-activated K⁺ channel</i>	
TASK	engl. <i>TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel</i>	
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin	28
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>	23
TEVC	Technik der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (engl. <i>two electrode voltage clamp</i>)	24
THIK	engl. <i>Tandem pore domain halothane inhibited K⁺ channel</i>	
TMV	Tabakmosaikvirus	19
TRAAK	engl. <i>TWIK-related arachidonic acid-stimulated K⁺ channel</i>	
TREK	engl. <i>TWIK-related K⁺ channel</i>	
TRESK	engl. <i>TWIK-related spinal cord K⁺ channel</i>	8
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan.....	25
tRNS	Transfer-RNS	16
TWIK	engl. <i>Tandem of pore domains in a weak inwardly rectifying K⁺ channel</i>	
UTP	Uridintriphosphat	

1 Einleitung

Ionenkanäle erlauben einen extrem schnellen Fluss von etwa 10^8 Ionen pro Sekunde über die Zellmembran, eine Rate nahe der Diffusionsgrenze und Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Transportprozessen um den Faktor von einer Million überlegen. Sie existieren in der Form von Anionenkanälen, Kationenkanälen oder unselektiven Ionenkanälen in allen Zellen und Zellorganellen und ermöglichen die für verschiedenste zelluläre Prozesse notwendige Ionenhomöostase. Erst die hohe Selektivität für eine Ionenart ermöglicht essentielle biologische Funktionen wie die Generierung und Fortleitung von Aktionspotenzialen in Neuronen, die Kontraktion von Muskeln oder die Ausschüttung von Hormonen. Die größte Gruppe unter den Ionenkanälen stellen die kaliumselektiven Kanäle, für die über 80 Gene im menschlichen Genom kodieren und deren Vielfalt durch Spleißvarianten, Heteromerisierung und regulatorische Untereinheiten noch vergrößert wird. Sie lassen sich grob in die vier übergeordneten Familien spannungsaktivierter Kanäle (K_v , *voltage activated*), kalziumaktivierter Kanäle (K_{Ca}), einwärtsrektifizierender Kanäle (K_{ir} , *inwardly rectifying*) und Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle (K2P) einteilen, die modular aufgebaut sind.

Allen Kaliumkanälen ist ein Minimalaufbau eigen, welcher aus zwei Transmembran-(TM) und einer Intramembranhelix mit Schleife als Porensegment (P) gebildet wird. Diesen „2TM 1P“-Aufbau findet man bei den K_{ir} -Kanälen, deren wichtiger Vertreter z.B. der an Insulinausschüttung beteiligte K_{ATP} -Kanal ist (Überblick in Hibino et al. (2010)). Funktionelle Kanäle bestehen aus vier solcher Einheiten, die tetrasymmetrisch angeordnet sind. Die Selektivität für Kalium gegenüber Natrium liegt in Kaliumkanälen bei 1000 bis 10000:1, obwohl sich die Pauling-Ionenradien nur um $0,38 \text{ \AA}$ unterscheiden. Ermöglicht wird dies durch die stark konservierte Konsensussequenz TVGYG an der engsten Stelle der vierfach symmetrischen Pore, dem Selektivitätsfilter, der Kaliumionen mit Hilfe der Carbonylsauerstoffe des Proteinerückgrats oktaedrisch koordiniert und so ihre Hydrathülle während der Permeation passgenau ersetzt. Die Aufklärung dieser atomaren Grundlagen wurde 2003 mit dem Nobelpreis für Chemie für Roderick MacKinnon honoriert. K_v -Kanäle besitzen zusätzlich zum Porenmodul vier weitere Transmembranhelices (Überblick in Kuang et al. (2015)). Charakteristisch ist der Spannungssensor, der in allen Kanälen aus dem S4-Segment besteht und positiv geladene Aminosäuren enthält. Diese bewegen sich bei Potenzialänderungen innerhalb der Membran und öffnen den Selektivitätsfilter bei Depolarisation. Ein wichtiger Kanal mit diesem „6TM 1P“-Aufbau ist der K_v 11.1-Kaliumkanal (*hERG*)-Kanal, der in Herzmuskelzellen für die schnelle Repolarisierung verantwortlich ist. K_{Ca} -Kanäle besitzen sechs oder sieben Transmembrandomänen, darunter wieder das Porenmodul und der S4-Spannungssensor („6/7TM 1P“). Als kalziumaktivierte Kanäle besitzen sie außer-

dem kalziumbindende Domänen wie regulatorische Untereinheit oder Domäne einiger Kaliumkanäle (RCK) im zytoplasmatischen Carboxyterminus. Sie regulieren wie z. B. der BK-Kanal die Entladung von Neuronen und die Transmitterfreisetzung. Die Unterfamilie der K2P-Kanäle zeigt als einzige einen „4TM2P“-Aufbau. Zwei Porenmodule sind im Tandem miteinander verbunden, so dass diese Kaliumkanäle als Dimere funktionell sind. Die K2P-Kanäle stellen die zuletzt entdeckte Kaliumkanalüberfamilie dar und Vertreter dieser Überfamilie wurden in dieser Arbeit untersucht.

1.1 Die Familie der Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle (K2P-Kanäle)

Mit TWIK1 wurde 1996 der erste Zwei-Porendomänen-Kaliumkanal kloniert (Lesage et al., 1996a) und bis heute wurden 15 menschliche K2P-Kanäle beschrieben, die sich anhand ihrer Sequenzhomologie, ihrer Regulationsmechanismen und ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften in die sechs Unterfamilien TWIK, THIK, TASK, TREK, TALK und TRESK gliedern lassen (Abb. 1A, Honoré (2007)). Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle entstanden vermutlich durch Genduplikation des Porensegmentes und existieren (oft mit abweichender Helixanzahl) in allen Eukaryoten wie z.B. dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*, Hefen und höheren Pflanzen (González et al., 2015).

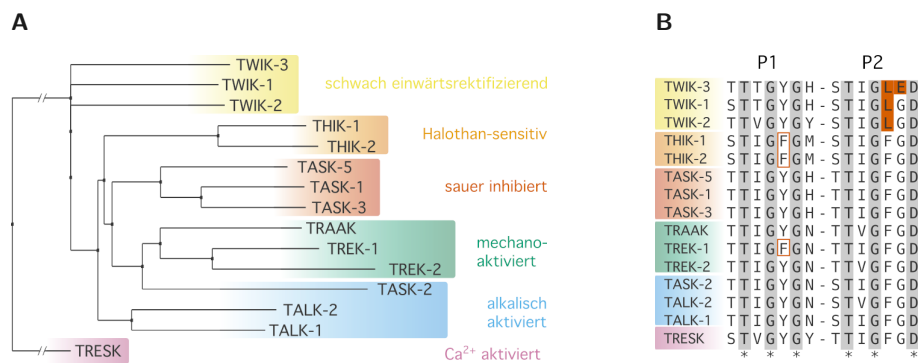


Abbildung 1: Unterteilung und Verwandtschaft der K2P-Familie und Signaturmotive von K2P-Kanälen. **A** K2P-Kanäle werden nach Sequenzhomologie in sechs Unterfamilien unterteilt. Die Verwandtschaftsdistanzen beziehen sich auf den Grad der Aminosäuresequenzhomologie und wurden mit ClustalΩ 2.1 unter Verwendung der BLOSUM62-Scoringmatrix berechnet. Das Phänogramm wurde mit dem Neighbor-Joining-Algorithmus in Jalview2 erstellt. **B** Vergleich der charakteristischen Aminosäuresequenz der Selektivitätsfilterregion innerhalb der K2P-Kanalfamilie. Orange Rahmen zeigen die im Vergleich zum Signaturmotiv abweichenden Phenylalanine in Porensegment 1, orange unterlegte Positionen heben die ungewöhnlichen Poren der TWIK-Unterfamilie hervor. Konservierte Positionen sind grau unterlegt und mit Sternen markiert.

Die Grundstruktur eines K2P-Monomers besteht aus vier Transmembranhelices (M1–M4) mit einem relativ kurzen, intrazellulären Aminoterminus (N-Terminus) und einem ausgeprägten Carboxyterminus (C-Terminus), der auch als C-terminale regulatorische Domäne bezeichnet wird (Abb. 2; Patel und Honoré (2001)). Die ersten beiden Transmembranhelices M1 und M2 werden von einer langen extrazellulären Schleife verbunden, die die α -helikale Kappe herstellt und vor M2 in die Membran eintaucht, um die erste Porenhelix zu bilden. Die zweite extrazelluläre Schleife formt die zweite Porenhelix zwischen M3 und M4. Diese Architektur der zwei aufeinanderfolgenden Porendomänen (P1 und P2) ist charakteristisch für die K2P-Kanäle und verlieh ihnen ihren Namen. Im Gegensatz zu den anderen K^+ -Kanalklassen mit tetramerem Aufbau genügen bei K2P-Kanälen also zwei Untereinheiten, um die für die Kaliumselektivität nötige vierfache Symmetrie der Pore herzustellen.

Vergleicht man die Selektivitätsfiltersequenzen in den beiden Poren innerhalb der K2P-Kanäle wie in Abb. 1B, weisen THIK1-, THIK2- und TREK1-Kanäle ein GFG-Motiv auch in der ersten Pore auf. Auffälliger ist jedoch die zweite Pore der TWIK-Unterfamilie, in der die Konsensussequenz zu GLG und beim TWIK3-Kanal sogar zu GLE verändert ist. TWIK1 und TWIK2 bilden trotzdem funktionelle Kanäle und sind elektrophysiologisch messbar, wenn auch mit kleinen Strömen in Kaliumlösungen (Lesage et al. (1996a) bzw. Chavez et al. (1999)). Das TWIK3-Protein hingegen konnte noch nicht zu funktioneller Expression gebracht werden und ist zusammen mit dem TASK5-Kanal der letzte „stumme“ K2P-Kanal. Warum diese beiden Kanäle in Zellen oder *Xenopus-laevis*-Oocyten offenbar nicht funktionell sind und weshalb die Poren von TWIK1- und TWIK2-Kanälen trotz der ungewöhnlichen Sequenz funktionieren, bleibt bisher ungeklärt.

K2P-Kanäle wurden zuerst als Hintergrundkanäle beschrieben, die für das von Goldman, Hodgkin und Katz postulierte Kaliumleck in erregbaren Zellen verantwortlich gemacht wurden. Inzwischen ist bekannt, dass die meisten Vertreter spannungsabhängig sind und erst durch Aktivierung in lineare „Leck“kanäle überführt werden (Bockenhauer et al., 2001; Chemin et al., 2005b; Schewe et al., 2016). Sie werden von extra- und intrazellulären Stimuli wie Temperatur, mechanischem Zug, Membranlipiden wie Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP_2), mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Arachidonsäure, Lysophospholipiden, Phosphorylierung, Hypoxie und pH-Wert reguliert und durch chemische Verbindungen wie Anästhetika und Antidepressiva beeinflusst (Felicangeli et al., 2015). Diese polymodale Regulation hat von der Sichtweise reiner Hintergrundkanäle hin zu einem Verständnis von K2P-Kanälen als molekulare Sensoren geführt, die die Integration verschiedenster intrazellulärer Signalwege und äußerer Stimuli leisten und damit wichtige Regulatoren zellulärer Erregbarkeit sind (Renigunta et al., 2015).

Mitglieder der K2P-Kanalunterfamilien werden im Körper in unterschiedlichem Aus-

maß in zentralnervösen und peripheren Geweben exprimiert und sind an unterschiedlichsten physiologischen Prozessen beteiligt (Felicciangeli et al., 2015). Den mechanosensitiven TREK1-Kanal findet man z.B. in glatten Gefäßmuskelzellen (Ma et al., 2018) und der Blut-Hirn-Schranke (Bittner et al., 2013). TREK-Kanäle sind ebenfalls stark in der Retina (Hughes et al., 2017) und im Nervensystem, z.B. Spinalganglien und dem Thalamus (Bista et al., 2014) und in Astrozyten vertreten (Ryoo und Park, 2016). Entsprechend reichen ihre physiologischen Einflussbereiche von der Endothelspannung über Schmerzempfindung, Anästhesie und Schlaf bis hin zur Depression (Renigunta et al., 2015); durch die Hyperpolarisation der Membran wirken sie neuroprotektiv (Franks und Honoré, 2004). Auch TWIK-Kanäle wurden im Zentralnervensystem in Astrozyten beschrieben (Wang et al., 2013), könnten aber auch an entzündlichen Prozesse beteiligt sein (Di et al., 2018). Die TASK-Kanäle modulieren beispielsweise die Repolarisation im Herzen (Decher et al., 2015), die Aldosteronsekretion in der Niere und wirken als Chemosensoren in Glomuszellen und Raphéneuronen (Bayliss et al., 2015). Der TRESK-Kanal ist in Spinalganglienneuronen an der Schmerzempfindung und im Zentralnervensystem an der Entstehung von Migräne beteiligt (Enyedi und Czirják, 2015). Die TALK-Kanäle wurden u.a. im Pankreas lokalisiert, wo sie an der Bicarbonat- und Insulinsekretion mitwirken (Vierra et al., 2018). Interessanterweise könnten die THIK-Kanäle eine Rolle in der Zellschrumpfung während der Apoptose in Embryonalentwicklung und Gewebeumbildung (Sakamaki et al., 2016) spielen.

Im Jahr 2012 wurden mit den *h*TWIK1- und *h*TRAAK-Strukturen die ersten Kristallstrukturen von K2P-Kanälen aufgeklärt (Miller und Long, 2012; Brohawn et al., 2012), bald gefolgt von *h*TREK2- (Dong et al., 2015) und *h*TREK1-Kanälen (Lolicato et al., 2017), die mit verschiedenen Ionenbedingungen und kokristallisierten Liganden neue Erkenntnisse zu Struktur-Funktions-Beziehungen ermöglichten. Ein Überblick über die bisher in der *Protein Data Bank* (PDB) veröffentlichten Strukturen und Referenzen gibt Tabelle 1, und Abb. 3 veranschaulicht die im Folgenden angesprochenen Punkte anhand der Kristallstruktur des trunkierten *h*TREK2-Kanals.

So besitzen K2P-Kanäle eine unter den Kaliumkanälen einzigartige extrazelluläre Kappenstruktur, in der die M1-P1-Schleifen eine aufstrebende äußere und eine Richtung Membran zurückkehrende innere Helix bilden, die seitlich zwei kleine Tunnel als Ausstromwege für die aus dem Selektivitätsfilter tretenden Kaliumionen formen (Überblick in Zúñiga und Zúñiga (2016)). Die Kappe ragt etwa 35 Å über die Membran hinaus und ihre genaue Funktion und evolutionäre Entwicklung ist bislang ungeklärt. In den TWIK1- und ersten TRAAK-Kristallstrukturen wurden innere und äußere Kappenhelix zunächst als zur gleichen Untereinheit gehörend angesehen. Brohawn et al. (2013) und Dong et al. (2015) identifizierten im TRAAK- bzw. TREK2-Kanal jedoch eine Überkreuzung des Proteinrückgrades an der Kappenspitze und damit einen engen

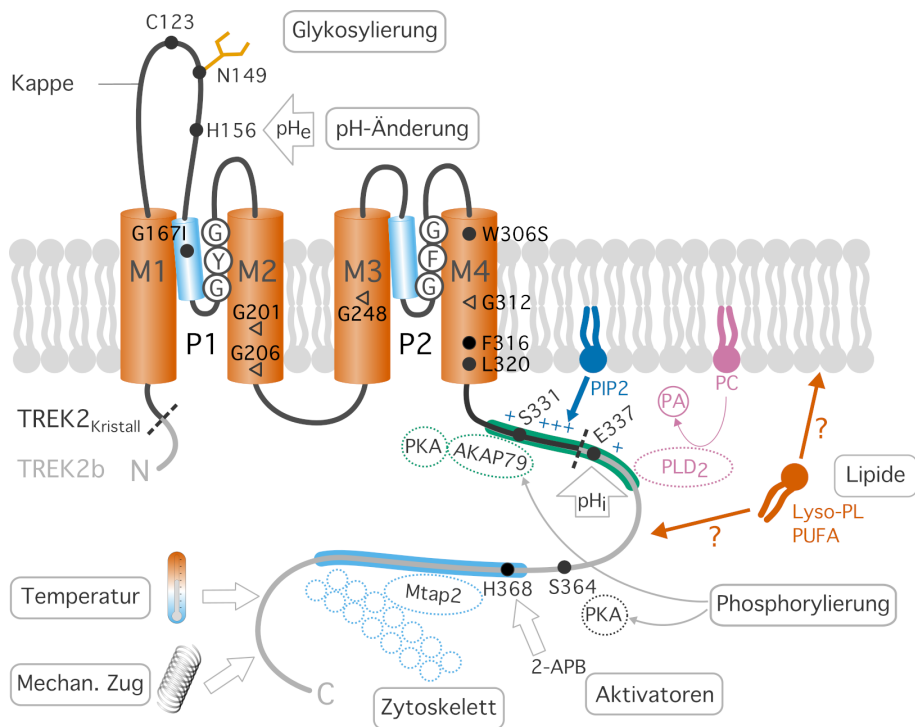


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der K2P-Kanäle und Regulationsmechanismen von TREK-Kanälen. **A** Schemazeichnung eines Monomers mit vier Transmembranhelices M1–M4 und zwei Porendomänen P1 und P2 jeweils mit Porenhelices (blau) und Signatursequenz. Die lange extrazelluläre Schleife zwischen M1 und M2 bildet die Kappenstruktur mit der postulierten Disulfidbrücke C123, der Glykosylierungsstelle N149 und dem extrazellulären pH-Sensor H156 (pH_e). Sowohl N- als auch C-Terminus liegen intrazellulär, die Trunkierungsstellen von TREK2_{Kristall} sind durch gestrichelte Linien angedeutet. In den Transmembrandomänen liegen die Glycinscharniere (offene Dreiecke) sowie die *gain of function*-Mutationen G167I und W306S (gefüllte Kreise). F316 und L320 markieren den Fensterungseingang in M4. Am C-Terminus setzen vielfältige Regulationsmechanismen an, die in Abschnitt 1.1 beschrieben werden. Die Aminosäurenummerierung orientiert sich an der verwendeten Isoform TREK-2b (P57789-4).

Kontakt zwischen äußerer Helix eines und innerer Helix des zweiten Monomers (engl. *domain swapping*). Solche verflochtenen *coiled-coil*-Strukturen dienen oft der Proteininteraktion, und die Kappe könnte eine wichtige Rolle bei der Dimerisierung der Kanaluntereinheiten spielen (Goldstein et al., 2016). Zusätzlich ist in den K2P-Kanalfamilien außer TASK und THIK ein Cystein am Umkehrpunkt der M1-P1-Schleife konserviert, und eine Disulfidbrücke zwischen den Monomeren wurde für einige Kanäle wie TWIK1, TREK1, TRAAK und TASK2 und den TREK1/TWIK1-Heteromer nachgewiesen. Inwiefern diese kovalente Verbindung relevant für die funktionelle Expression und Aktivität der Kanäle ist, wird diskutiert (Lesage et al., 1996b; Niemeyer et al., 2003; Hwang et al., 2014). Die Kappe verleiht den K2P-Kanälen auch eine Resistenz gegen Toxine,

die bei anderen Kaliumkanälen am extrazellulären Porenausgang binden, sowie die Insensitivität gegenüber klassischen Kaliumkanalblockern (Brohawn et al., 2012; Miller und Long, 2012).

Der Selektivitätsfilter enthält die Ionenbindungsstellen S1–S4, sowie die zusätzlich benannten S5- und S0-Stellen am Porenein- und ausgang (siehe Vergrößerung in Abb. 3A rechts). Die Permeation des Kaliumions erfolgt von S5 in der cytoplasmaseitigen Porenhöhle (*cavity*) bis hin zur äußeren S0-Stelle, an der es in das extrazelluläre Milieu entlassen wird. Zur Besetzung der Ionenbindungsstellen und zum Permeationsmechanismus existieren widerstreitende Theorien. Schon von Doyle (1998) bei der Beschreibung der ersten Kristallstruktur eines Kaliumkanals vermutet, wurde auch für K2P-Kanäle angenommen, dass aufgrund der elektrostatischen Abstoßung nur jede zweite Bindungsstelle von K^+ besetzt wird und dass Kaliumionen und Wassermoleküle alternierend im Selektivitätsfilter binden. Dagegen steht die von Köpfer et al. (2014) aus Molekulardynamiksimulationen entwickelte Hypothese eines *'direct-knock-on'*-Anstoßeffektes mit direkt nebeneinanderliegenden Kaliumionen in den S2- und S3-Koordinationsstellen, die bei Eintritt eines weiteren Ions Richtung extrazellulär gestoßen werden, so dass der Filter voll besetzt wird. Durch diese Coulomb-Abstoßung zwischen den Ionen werde die hohe Permeationsrate von Kaliumkanälen und auch die hohe Selektivität ermöglicht (Köpfer et al., 2014; Kopec et al., 2018).

Im Vergleich mit spannungsaktivierten K^+ -Kanälen fällt ins Auge, dass K2P-Kanäle keinen kanonischen Spannungssensor in der Form eines positiv geladenen S4-Segementes besitzen, dessen Bewegung in K_v -Kanälen für die Aktivierung des Selektivitätsfilters verantwortlich ist. Tatsächlich wurden K2P-Kanäle lange als Hintergrund- oder Leckkanäle beschrieben, die das Ruhemembranpotenzial stabilisieren, aber im Gegensatz zu K_v -Kanälen nicht durch Depolarisierung aktiviert werden. Dies ist jedoch nur für den zuerst beschriebenen TWIK1-Kanal der Fall. Die in Schewe et al. (2016) untersuchten K2P-Kanäle zeigten eine deutliche Spannungsaktivierung mit Auswärtsgerichtung, und die spannungsabhängige Aktivierung erfolgte direkt durch die Bewegung von Kaliumionen im dort fokussierten elektrischen Feld des Selektivitätsfilters. Erst eine Aktivierung der Kanäle z.B. mit Arachidonsäure oder aber die Mutation eines Threonins der S4-Kaliumbindungsstelle unterhalb des Selektivitätsfilters überführte sie in Kanäle mit einer linearen Strom-Spannungs-Beziehung.

In allen bisher kristallisierten Kanälen befinden sich innerhalb des Transmembranbereichs zwei seitliche Fenestrierungen (Abb. 3B) direkt unterhalb des Selektivitätsfilters, die je nach eingenommener Konformation einen Zugang zur Pore ermöglichen und auch Bindungsstellen für Inhibitoren wie Norfluoxetin (Dong et al., 2015) und Aktivatoren wie BL-1249 (Schewe et al., 2019) enthalten. Sequenzvergleiche insbesondere der in vielen K2P-Unterfamilien konservierten Aminosäuren am Fenestrierungsausgang (L304

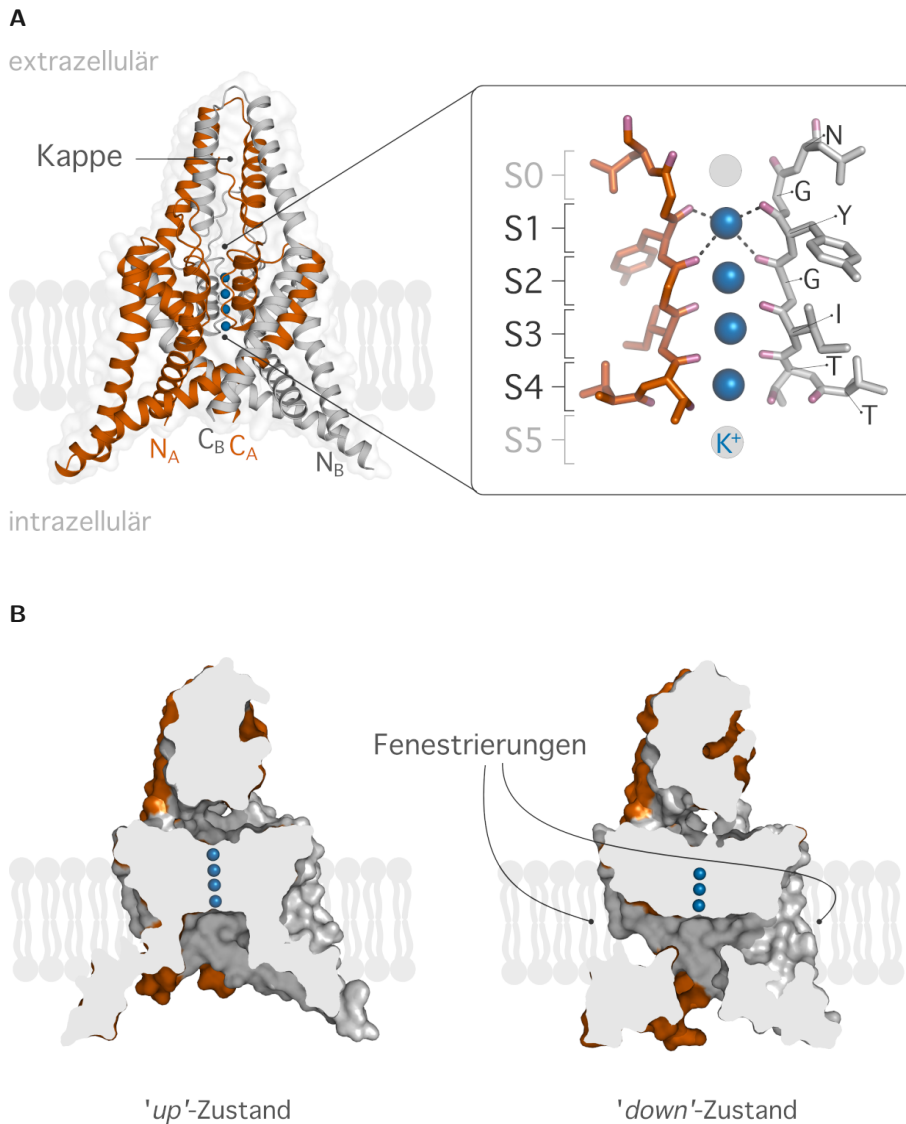


Abbildung 3: Struktur der K2P-Kanäle. **A** Kristallstruktur des trinktierten *hTREK2*-Homodimers mit extrazellulärer Kappe mit 'domain swap' und Transmembranhelices im *up*-Zustand (erstellt aus PDB ID 4BW5, links). Die beiden Untereinheiten A und B sind orange und grau eingefärbt. N_A und C_A : Amino- bzw. Carboxyterminus der Untereinheit A; ebenso N_B und C_B : Termini der Untereinheit B des Kristallkonstrukts. Die vergrößerte Ansicht des Selektivitätsfilters im Längsschnitt zeigt die Signatursequenz und die Ionenbindungsstellen S0–S5 (rechts). Die $C\alpha$ der Signatursequenz sind beschriftet und die Koordination von K^+ durch die Carbonylsauerstoffe (magenta) ist an S1 angedeutet. **B** Eine Schnittebene durch die Kristallstruktur verdeutlicht die Lage der im *up*-Zustand (links) verlegten und im *down*-Zustand (rechts) zugänglichen Fenestrierungen unterhalb des Selektivitätsfilters.

in TREK1-, L320 in TREK2-Kanälen) und Mutageneseexperimente unter Verwendung o.a. Pharmaka lassen vermuten, dass die meisten K2P-Kanäle solche Fenestrierungen aufweisen (Schewe et al., 2019). Bemerkenswert ist, dass auch in weiteren K^+ -Kanälen solche Taschen unter dem Selektivitätsfilter existieren, so etwa in den kryoelektronenmikroskopischen Strukturen von *hERG* (Wang und MacKinnon, 2017) und BK-Kanälen (Tao et al., 2017) als Vertreter der K_v - und K_{Ca} -Überfamilien, die eine Polypharmakologie bestimmter in der Fenestrierung bindender Aktivatoren erklären könnten (Schewe et al., 2019).

Physiologisch werden K2P-Kanäle durch eine Vielzahl von Stimuli geschaltet. Aus Studien an K_v - und K_{ir} -Kanälen sind zwei Schaltstellen (engl. *gate*) bekannt, das extrazelluläre oder Selektivitätsfilter-*Gate* und das intrazelluläre *Gate*, eine Überkreuzung im unteren Membranhelixbereich '*Helix-Bundle-Crossing*', die Kaliumionen den Eintritt physisch verwehrt und sich bei Aktivierung über ein Glycinscharnier öffnet (Kuang et al., 2015). Letztere Schaltstelle wurde für K2P-Kanäle ausgeschlossen und dieses Aktivierungsgate ist konstitutiv offen (Piechotta et al., 2011). Der offene Porenzugang war auch in den verschiedenen TRAAK- und TREK2-Kristallstrukturen sichtbar. Die primäre Schaltstelle der K2P-Kanäle liegt im oder nahe am Selektivitätsfilter und wird auch Inaktivierungs- oder *C-type gate* genannt. Nach bisherigen Erkenntnissen konvergieren alle Stimuli in K2P-Kanälen auf dieses Selektivitätsfilter-*Gate* (Bagriantsev et al., 2011), sowohl von nahegelegenen Sensoren wie dem extrazellulären pH-Sensor, als auch von den vielfältigen am Carboxyterminus wirkenden Modulatoren. Die Kopplung von C-Terminus und Selektivitätsfilter erfolgt prinzipiell über die kovalent verbundene M4-Helix der eigenen Untereinheit, der genaue Übertragungsmechanismus ist jedoch noch ungeklärt (Mathie et al., 2010; Bagriantsev et al., 2012; Zhuo et al., 2016).

In einigen K2P-Kanälen liegen möglicherweise noch andere Schaltmechanismen vor. Für den TWIK1-Kanal wurde ein hydrophobes Schalten postuliert, in dem die Verdrängung von Wasser aus einem bestimmten, mit hydrophoben Seitenketten ausgekleideten Porenabschnitt zu einer Energiebarriere führt, die die Permeation von Kaliumionen unterbindet (Aryal et al., 2014). Ähnliches könnte für engl. *TWIK-related spinal cord K^+ channel* (TRESK)-Kanäle gelten, die nach Strukturmodellen eine ungewöhnliche Einengung der zentralen Pore durch vier ringförmig angeordnete Phenylalanine besitzen (Kim et al., 2013). Der TRESK-Kanal unterscheidet sich durch eine ausgeprägte intrazelluläre Schleife zwischen M2 und M3 mit einer Calcineurin-Phosphorylierungsstelle und einem vergleichsweise kurzen Carboxyterminus von allen anderen K2P-Kanälen und unterliegt möglicherweise anderen Regulationsmechanismen.

Brohawn et al. (2014) postulierten anhand der Strukturen 4WFE–4WFH von TRAAK_{Kristall} für die Mechanoaktivierung, dass Membranlipide in die Fenestrierungen eindringen und die Permeation unterbinden könnten. Der Schluss der Fenestrierungen beim Übergang

vom *down*- in den leitenden *up*-Zustand sollte die Acylketten aus dem Permeationsweg verdrängen und den Ionenfluss ermöglichen. Diese Hypothese wurde aufgrund der schon in der TWIK_{Kristall}-Struktur (Miller und Long, 2012) sichtbaren Lipidschwänze schon von Nilius und Honoré (2012) theoretisch formuliert.

Die Fragen nach Schaltstellen und Strukturänderungen wurden auch kristallographisch adressiert. Lolicato et al. (2014) kristallisierten eine TRAAK-Mutante mit den von Bagriantsev et al. (2011) identifizierten aktivitätssteigernden *gain of function*-Mutationen G124I und W262S und fanden den Kanal im sogenannten '*down*'-Zustand mit nach unten gerichteten Transmembranhelices. Sie schlossen daraus, dass es sich um die leitfähige Form handeln müsse. Brohawn et al. (2014) sahen die unteren Helixabschnitte in Richtung Membran gehoben, wenn der Aktivator Trichlorethanol anwesend war und identifizierten folglich diesen '*up*'-Zustand als den leitfähigen. Die unterschiedlich interpretierten *up*- und *down*-Strukturen des TRAAK-Kanals erschienen damit zunächst gegensätzlich. Dong et al. (2015) konnten *h*TREK2-Kanäle in beiden Zuständen kristallisieren und zeigten außerdem mit Hilfe des Inhibitors Norfluoxetin, welcher nur im *down*-Zustand in der Fenestrierung binden kann, dass diese im *up*-Zustand durch die M4-Bewegung von F316 und L320 verlegt waren. Der Selektivitätsfilter war im *up*-Zustand voll besetzt, was nach der oben beschriebenen *direct-knock-on*-Theorie dem leitenden Kanal entspräche. Sie schrieben diesem *up*-Zustand, der durch Mechano- und Arachidonsäureaktivierung stabilisiert wurde, daher eine hohe Aktivität zu. Im wenig aktiven *down*-Zustand waren hingegen nur drei Kaliumionen anwesend, wie dies aber in allen bisherigen TRAAK-Strukturen, auch dem *up*-Zustand, beobachtet worden war. Dong et al. (2015) schlossen aber nicht aus, dass das Selektivitätsfilter-*Gate* unabhängig vom Zustand der Transmembranhelices funktionieren kann, denn auch die Aktivierung durch intrazelluläre pH-Senkung beeinflusste nicht die Norfluoxetinbindung und musste über einen anderen Mechanismus wirken. Diese Sichtweise bestärkten McClenaghan et al. (2016), indem sie zeigten, dass die Fenestrierungen in den äquivalenten *gain of function*-Mutationen im TREK2-Kanal, G167I und W306S, für Norfluoxetin zugänglich sind und somit auch die *down*-Konformation ein leitender Zustand sein kann.

Das derzeitige Modell beinhaltet nun verschiedene Aktivierungsmechanismen, die je nach Stimulus direkt auf das Selektivitätsfilter-*Gate* wirken, ohne die Fenestrierungen zu schließen (o.g. Mutationen, intrazelluläre pH-Senkung und Rubidium als permeierendes Ion) oder aber den *down-up*-Übergang mit Bewegung von M2, M3 und M4 an Glycinscharnieren hervorrufen (Temperatur- und Mechanoaktivierung), so dass eine einfache offen/geschlossen-Interpretation des *up*- und *down*-Zustands dem vielfältig regulierten Kanal nicht gerecht wird und mehrere ineinander umwandelbare geöffnete Zustände existieren müssen.

Für die Strukturaufklärung oder die Untersuchung in künstlichen Membranen folgt ei-

Tabelle 1: Übersicht der in der *Protein Data Bank* bis Januar 2019 abgelegten Kristallstrukturen von K2P-Kanälen.

Kanal	Spezies	Literatur	PDB	Residuen	Expression	Eigenschaften
TWIK1	<i>h</i>	Miller und Long (2012)	3UKM	23–288	<i>Kp.</i>	Apoprotein
TRAAK	<i>h</i>	Brohawn et al. (2012)	3UM7	1–274	<i>Kp.</i>	Apoprotein
	<i>h</i>	Brohawn et al. (2013)	4I9W	1–274	<i>Kp.</i>	'domain swap'
	<i>h</i>	Brohawn et al. (2014)	4WFE	1–264	<i>Kp.</i>	K ⁺ , leitend
			4WFF			K ⁺ , nichtleitend
			4WFG			Tl ⁺ , leitend
	<i>h</i>	Lolicato et al. (2014)	4WFH	1–274	<i>Kp.</i>	Tl ⁺ , nichtleitend
			4RUE			G124I
			4RUF			W262S
TREK2	<i>h</i>	Dong et al. (2015)	4BW5	62–335	<i>Sf.</i>	'up'-Zustand
			4XDJ			'down'-Zustand
			4XDK			Norfluoxetin-Komplex
			4XDL			Fluoxetin-Komplex
TREK1	<i>h</i>	Pike et al. [†]	4TWK	41–315	<i>Sf.</i>	deformierter SF
	<i>m</i>	Lolicato et al. [†]	5VKP	35–337*	<i>Kp.</i>	ML402-Komplex
	<i>m</i>	Lolicato et al. (2017)	6CQ6	35–337*	<i>Kp.</i>	Apoprotein
			6CQ8			ML335-Komplex
			6CQ9			ML402-Komplex

h, *Homo sapiens*; *m*, *Mus musculus*; *K. p.*, *Komagataella pastoris*; *S. f.*, *Spodoptera frugiperda* Zellen;
* mit 13 Mutationen; [†] ohne Veröffentlichung

ner rekombinanten Expression von Ionenkanälen die Isolierung aus der zellulären Membranumgebung durch Solubilisierung mit Detergenzien, eine anschließende Reinigung und eventuell die Rekonstitution z.B. in Proteoliposomen oder größere unilamellare Vesikel. Die Erhaltung des nativen Zustands auf allen Stufen der Herstellung ist für Membranproteine eine besondere Herausforderung. Für die zur Röntgenkristallstrukturaufklärung in Hefe und Insektenzellen exprimierten K2P-Kanäle war es erforderlich, durch Trunkierung von Amino- und Carboxyterminus sowie durch zusätzliche Mutationen wie z.B. in Lolicato et al. (2017) das benötigte Expressionsniveau zu erreichen und die biochemischen Eigenschaften für Reinigung und Kristallisation zu verbessern. Die Funktionsfähigkeit dieser gekürzten Konstrukte (im folgenden $K2P_{\text{Kristall}}$) an sich wurde von den Autoren teilweise durch *Patch-Clamp*-Messungen nach heterologer Expression in HEK 293-Zellen oder *Xenopus*-Oocyten bewiesen. Interessanter zur Bewertung der Proteinstabilität und letztlich Verlässlichkeit der Kristallstruktur ist allerdings die Untersuchung des solubilisierten und gereinigten Kanals. Die funktionelle Faltung des für die Kristallisation verwendeten Proteins wurde bei *hTWIK1*_{Kristall}- (3UKM, Miller und Long (2012)) und *hTRAAK*_{Kristall}-Kanälen (3UM7, Brohawn et al. (2012)) durch einen K^+ -Efflux-Versuch mit in Proteoliposomen rekonstituiertem Protein überprüft. Im Falle von *hTRAAK*_{Kristall} (4WFE–4WFH, Brohawn et al. (2014)) wurde das Protein in Proteoliposomen rekonstituiert und diese zur Ausbildung großer unilamellarer Blasen gebracht, welche mit Hilfe von *Patch-Clamp*-Pipetten messbar waren. Die Funktion der *TREK2*_{Kristall}-Kanäle (4BW5 und 4XDJ–4XDL, Dong et al. (2015)) wurde im planaren *Bilayer* bestätigt.

Alle bisher verfügbaren Kristallstrukturen sind um N- und C-Terminus gekürzt und umfassen die Transmembranbereiche mit der extrazellulären Kappe (siehe Tabelle 1). Lolicato et al. (2017) gelang die Aufklärung weiterer Aminosäuren in der Verlängerung von M4 im proximalen Carboxyterminus, die vermutlich an der pH-Regulation von *TREK*-Kanälen beteiligt sind. Ungewiss bleibt jedoch, ob die Endbereiche kristallisierter Strukturen den Wildtypzustand widerspiegeln, ob Deformationen durch Kristallgitterkontakte auftreten oder das Fehlen der carboxyterminalen Domäne zu einer abweichenden Faltung dieser Helixenden führen kann.

Die Bedeutung von Glykosylierungen für K2P-Kanäle wurde nur für wenige K2P-Familienmitglieder untersucht und liegt nach bisherigen Erkenntnissen in der Stabilisierung der Kanäle an der Plasmamembran (Mant et al., 2013). Bioinformatisch vorhergesagt werden eine oder zwei Konsensusstellen für N-Glykosylierung in allen K2P-Kanälen außer *TASK5* innerhalb der extrazellulären kappenbildenden Schleife zwischen der ersten Transmembranhelix und der ersten Porenhelix, mit der höchsten Konservierung an der zu der für *TWIK1* beschriebenen homologen Position (ExpASy, Gasteiger et al. (2003)). Nicht alle Konsensusstellen scheinen tatsächlich Glykan-Akzeptorstellen

zu sein: Bei heterologer Expression von TRESK in *Xenopus laevis*-Oocyten war nur eine (N 70) von zwei vorhergesagten Stellen tatsächlich glykosyliert, die für die Oberflächenexpression notwendig war (Egenberger et al., 2010). Die Asparagin 95-Glykosylierung von TWIK1 wurde von Lesage et al. (1996a) postuliert und von Miller und Long (2012) im Rahmen von Kristallisationsversuchen bestätigt. Mant et al. (2013) stellten fest, dass für nicht an Asparagin 53 glykosylierte TASK1-, nicht aber für TASK3-Kanäle der Strom aufgrund verringerter Oberflächenexpression reduziert war und vermuteten eine geringere Stabilität der Kanäle an der Plasmamembran. Schließlich wurden zwei Glykosylierungsstellen in TWIK2 von Bobak et al. (2017) als neben der Signalsequenz notwendig für die lysosomale Lokalisation beschrieben, die genaue Funktion von TWIK2 im Endolysosom ist aber noch unbekannt.

Für viele wichtige Aktivierungsmechanismen scheint der Carboxyterminus als regulatorische Domäne zu wirken. Sensorregionen für Temperatur-, Mechano-, pH- und Lipidaktivierung liegen wahrscheinlich alle im proximalen C-Terminus (vgl. Abb. 2; Honoré (2007)).

Für die Temperaturregulation von TREK1- und TREK2-Kanälen ist der Carboxyterminus notwendig und eine Trunkierung um 103 Aminosäuren verhindert die Aktivierung des TREK1-Kanals (Maingret et al., 1999b). Die Temperaturempfindlichkeit verschwindet bei Exzision eines *Patches* aus der Zelle, was die Beteiligung eines intrazellulären Faktors wahrscheinlich macht. Auch die Entkopplung des C-Terminus von M4 durch drei flexible Glycine unterbindet die Temperaturaktivierung (Bagriantsev et al., 2012).

Der Protonensensor für intrazelluläre pH-Senkung liegt in TREK1- und TREK2-Kanälen, die beide aktiviert werden, nach bisherigen Erkenntnissen im proximalen C-Terminus an E321 bzw. E337 (Maingret et al., 1999b; Honoré et al., 2002). Die Residuen befinden sich in einem Abschnitt positiv geladener Reste, so dass eine Protonierung die Neutralisation der negativen Ladung bedeutet und eine Interaktion dieses Abschnitts mit Membranlipiden begünstigt. Diese Stabilisierung führt auch zur Sensibilisierung gegenüber Stimuli wie mechanischem Zug oder Lipiden. Das Modell der Membranassoziation erfordert strukturelle Änderungen der C-terminalen Domäne (Honoré et al., 2002). Die Übertragung des pH-Stimulus zum Selektivitätsfilter-*Gate* könnte nach Bagriantsev et al. (2012) die direkt verbundene M4 und die erste Porenhelix involvieren. Auch eine limitierte Bewegung von M4 ohne Übergang vom *down*- in den *up*-Zustand wird als Kopplungsweg zum Selektivitätsfilter diskutiert (McClenaghan et al., 2016).

Weiterhin enthält der Carboxyterminus vieler K2P-Kanäle potenzielle oder nachgewiesene Phosphorylierungsstellen. K2P-Kanäle können somit durch die Signalwege G-Protein-gekoppelter Rezeptoren moduliert werden. Bei TREK1- und TREK2-Kanälen bewirkt die die G_s -Signalkaskade die Phosphorylierung von S348 bzw. S364 durch Proteinkinase A. Dadurch wird die Interaktion eines Bereichs positiver Aminosäuren proximal

zu R326 bzw. K342 mit der negativen Membraninnenseite verringert, der C-Terminus möglicherweise von der Membran gelöst und der Kanal inhibiert (Patel et al., 1998; Lesage et al., 2000; Murbartián et al., 2005). G_q -Proteine inhibieren TREK1-Kanäle über die Aktivierung der Proteinkinase C und sequenzielle Phosphorylierung von S315 und S348 (Murbartián et al., 2005; Sandoz et al., 2011). Eine aktivierende Wirkung von G_i - und $G_{\beta\gamma}$ -Proteinen möglicherweise über direkte Kanalinteraktion wurde von Woo et al. (2012) vorgeschlagen. TREK1 wird daneben von G_q -aktivierbarer Phospholipase C reguliert (Lopes et al., 2005), die PIP_2 hydrolysiert.

Chemin et al. (2005a) zeigten die Bindung des C-Terminus der TREK1-Kanäle an die Membraninnenseite über einen positiv geladenen Phospholipidsensorbereich in der Region proximal zu R326 als Schaltmechanismus der PIP_2 -Aktivierung. Die Hydrolyse von PIP_2 und damit Aufhebung der elektrostatischen Interaktion mit positiv geladenen Aminosäureresten könnte die Loslösung des proximalen C-Terminus von der Membran verursachen und den Kanal schließen. Sandoz et al. (2011) korrelierten das Ausmaß dieser Membranassoziation der C-terminalen Domäne in einem Fluoreszenzexperiment mit der Aktivierung durch intrazellulären pH und PIP_2 . Kürzlich wurde die mögliche PIP_2 -Interaktionsstelle um drei in TREK1 und TREK2 konservierte Arginine erweitert (R344–346 bzw. R360–362; Soussia et al. (2018)).

Weitere Phospholipide der inwendigen Membranseite wie Phosphatidylinositol, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin aktivieren ebenfalls TREK-Kanäle (Chemin et al., 2005a). Lysophospholipide wie Lysophosphatidylcholin öffnen TREK-Kanäle hingegen von der extrazellulären Seite (Maingret, 2000), bei intrazellulärer Applikation wurde eine Inhibition des Grundstroms beobachtet. Diese Lipidregulation wurde auf einen indirekten Mechanismus zurückgeführt (Maingret, 2000; Perozo et al., 2002; Honoré, 2007): Die durch die große polare Kopfgruppe verursachte Kegelform der Lysophospholipide könnte bei Insertion in die Membranaußenseite eine konkave Membrankurvatur in Kanalnähe verursachen, die mechanischen Zug ausübt und die Öffnung mechanosensitiver Ionenkanäle bewirkt. Die bei der Hydrolyse von Phosphatidylcholin durch Phospholipase D freigesetzte Phosphatidsäure wirkte im Vergleich zu ihrer Lysoform nur schwach bei Applikation auf TREK-Kanäle (Chemin et al., 2005b). Comoglio et al. (2014) zeigten jedoch, dass Phospholipase D2 an den Carboxyterminus von TREK1 bindet, die lokale Konzentration der kurzlebigen Phosphatidsäure durch diese Mikrodomänenbildung erhöht und den Kanal so dauerhaft aktivieren kann.

Potente Aktivatoren der TREK/TRAAK-Kanäle sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure (Patel et al., 1998), die TREK-Ströme in der Größenordnung von 450 % bis 850 % erhöhen kann (Patel und Honoré, 2001). Als Wirkmechanismus wurde sowohl eine direkte Interaktion mit dem C-Terminus (Maingret, 2000; Patel et al., 2001) als auch der schon angesprochene indirekte Effekt über die Änderung

der Membrankurvatur postuliert. Arachidonsäure trägt eine kleine Kopfgruppe mit einem großen hydrophoben Alkylkettenteil, so dass sie im Vergleich zu den Lysophospholipiden eine umgekehrte Kegelform hat. In der Zellmembran sind geladene Lipide asymmetrisch verteilt, und die inwendige Membranseite enthält mehr negativ geladene Lipide. Die selbst negativ geladene Arachidonsäure würde präferentiell in die auswärtige, weniger negativ geladene Membranseite insertieren (Honoré, 2007; Perozo et al., 2002) und wie die Lysophospholipide eine konvexe Kurvatur erzeugen, die mechanosensitive Kanäle aktiviert. Für eine Bindungsstelle mehrfach ungesättigter Fettsäuren im C-Terminus spricht der Verlust der Aktivierung bei Trunkierung bzw. Austausch der cytoplasmatischen Domäne gegen die eines nicht arachidonsäuresensitiven Kanals in Kim et al. (2001). Auch der Erhalt der Arachidonsäureaktivierung im exzidierten Membran-*Patch* wurde angeführt (Patel et al., 1998; Maingret, 2000). Hingegen wurde von Brohawn et al. (2012); Dong et al. (2015) für die trunkierten Konstrukte TRAAK_{Kristall} und TREK2_{Kristall} gezeigt, dass die Arachidonsäureaktivierung erhalten bleibt und der C-Terminus nicht beteiligt ist. Dies konnte in diesem Labor bestätigt werden (persönliche Kommunikation Dr. Marcus Schewe und Prof. Dr. Thomas Baukrowitz, 2019).

Die Kanäle der TREK/TRAAK-Unterfamilie werden außerdem durch mechanischen Zug aktiviert (Patel et al., 1998; Bang et al., 2000; Lesage et al., 2000; Maingret et al., 1999a). Die Mechanoaktivierung wurde als stark reduziert beschrieben, wenn der C-Terminus verkürzt wird (Honoré et al., 2002). Brohawn et al. (2012) und Dong et al. (2015) zeigten dagegen, dass die trunkierten Konstrukte weiterhin mechanosensitiv sind. Übereinstimmend wurde eine Expansion des Kanals innerhalb der Membran mit Vergrößerung der Querschnittsfläche im cytoplasmaseitigen Helixbereich beschrieben, und mechanischer Zug kann den Kanal vom *down*- in den aktiveren *up*-Zustand überführen (Dong et al., 2015; Aryal et al., 2017). Eine Trunkierung verschiebt die Empfindlichkeit der Kanäle für die vorgestellten Stimuli wie mechanischen Stress oder Arachidonsäure und moduliert die Aktivierung im Vergleich zum Wildtypkanal.

Der in TREK1- und TREK2-Kanälen stark homologe proximale C-Terminus ist außerdem Bindungsort von Partnerproteinen (Plant et al., 2005). In Synapsen bindet das an der Mikrodomänenorganisation beteiligte Adapterprotein AKAP79 (*A-kinase anchoring protein 79*) nach Sandoz et al. (2006) an eine Ansammlung positiv geladener Aminosäuren, erhöht die Kanalaktivität und verhindert eine Modulation durch andere Stimuli wie Arachidonsäure und pH. Die Proform des Neurotensinrezeptors Sortilin assoziiert ebenfalls mit dem Carboxyterminus und begünstigt nach Erreichen der Plasmamembran die Internalisierung von TREK1-Protein (Mazella et al., 2010). Mtap2 (*microtubule associated protein 2*) vermittelt nach Bindung an einen weiter distal gelegenen Abschnitt positiv geladener Aminosäuren die Assoziation mit Mikrotubuli des Zytoskeletts und verstärkt die Oberflächenexpression sowohl von TREK1- als auch von TREK2-Kanälen (Sandoz

et al., 2008). Auch in anderen K2P-Unterfamilien ist die Bindung von Partnerproteinen an den Carboxyterminus nachgewiesen, so wurde beispielsweise das *Trafficking* von TASK1- und TASK3-Kanalprotein durch Bindung der Gegenspieler 14-3-3 und COPI (*coat protein complex 1*) für antero- und retrograden Transport gut untersucht (Zuzarte et al., 2009).

Noch unbekannt ist die Rolle des Carboxyterminus in der Dimerisierung von K2P-Kanälen und es sind keine dedizierten Kontaktflächen zur Dimerbildung bekannt. Für viele Kanäle wie eag, KCNQ, TRPM und SK sind superhelikale Interaktionen im Carboxyterminus relevant, die schon kotranslational an den Polysomen zur Assoziation der Untereinheiten führen (Deutsch, 2003; Schwappach, 2008). In K_v -Kanälen wurden von Li et al. (1992) daneben aminoterminal T1-Tetramerisierungsdomänen beschrieben. Möglicherweise ähneln K2P-Kanäle auch den K_{ir} -Kanälen und mehrere N- und C-terminale Domänen und Schleifen sind an der stabilen Interaktion beteiligt. Interessant wären solche Untersuchungen auch für Heterodimere, die für eine zunehmenden Zahl von K2P-Kanälen gefunden werden, so auch in der TREK-Unterfamilie für *hTREK1/hTWIK1* (Hwang et al., 2014), *hTREK1/hTREK2* (Lengyel et al., 2016) und sowohl *hTREK1* als auch *hTREK2* mit *hTRAAK* (Blin et al., 2016; Levitz et al., 2016). Solche Heteromere würden das bekannte Repertoire an Kaliumkanälen um solche mit neuen oder intermediären Eigenschaften und unterschiedlicher Regulation erweitern und könnten eine weitere Ausdehnung der physiologischen Relevanz von K2P-Kanäle bedeuten. Darüber hinaus liegen Bindungsstellen für einige Aktivatoren im Carboxyterminus, wie z.B. 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) im Bereich von H368 des TREK2-Kanals (Zhuo et al., 2015).

Obwohl also großes Interesse an der detaillierten Untersuchung des C-Terminus besteht, ist es bisher nur in einem Fall für murine TREK1-Kanäle gelungen, rekombinantes und gereinigtes Kanalprotein in seiner nativen Form und Länge in einer künstlichen liposomalen Membran zu messen und seine Mechanoaktivierung zu zeigen (Berrier et al., 2013). Eine solche rekombinante Expression vollständiger Kanäle ist wünschenswert, da Trunkierungen neben dem Verlust der C-terminalen Regulierungsmechanismen Einfluss auf die Einzelkanaleigenschaften haben. In der Untersuchung von Clausen et al. (2017) zur Mechanoaktivierung anhand des TREK2_{Kristall}-Kanals im planaren *Bilayer* ist beispielsweise zu sehen, dass der Einzelkanalleitwert mit ~ 305 pS bei -80 mV sehr viel höher lag als für den Kanal bisher beschrieben (Bang et al., 2000; Lesage et al., 2000). Für systematische Untersuchungen wäre es jedoch wünschenswert, wenn Abweichungen zu den Wildtypkanälen minimal wären.

Herausforderungen bei der rekombinanten Expression vollständiger Membranproteine reichen von der Codon-Verwendung über die Aggregation und Zytotoxizität bei hohem Expressionsniveau bis zur schwierigen oder kostenintensiven Skalierung der Herstellung

für eine lohnenswerte Ausbeute. Es schließen sich die Problemfelder der Solubilisierung und Stabilisierung der Membranproteine während der Isolierung und Reinigung sowie die Etablierung eines geeigneten Messsystems an. Gerade für Fragestellungen wie die Lipidregulation sind funktionelle Untersuchungen außerhalb des zellulären Kontexts wichtig, da die Lipidumgebung kontrolliert manipuliert werden kann. Ein Beispiel ist die im Körper bei entzündlichen Prozessen freigesetzte Arachidonsäure, für die nicht geklärt ist, ob eine direkte Wechselwirkung mit dem Kanal oder ein indirekter Effekt durch einseitigen Einbau in die umliegende Membran die starke Aktivierung bei vielen Vertretern der K2P-Kanäle verursacht (Honoré, 2007). Schließlich bietet eine rekombinante Expression und die Messung im *Bilayer*-System die Perspektive, sich den bisher wenig charakterisierten „stillen“ Kanälen zu nähern und die Probleme einer strikt intrazellulären Lokalisation, unentdeckter Retentionsmotive, vielleicht anderer Ionenselektivität oder aus anderem Grund geringer Ströme in zellulären Messsystemen zu adressieren. Die vorliegende Arbeit soll dazu einen Anfang bilden und die Möglichkeit andersartiger Herstellungsstrategien für Messungen in künstlichen Membranen ausloten.

1.2 Zellfreie Expression

Eine Alternative zu den bisher verwendeten heterologen Expressionssystemen, die keine Zellkultur erfordert und mehr Möglichkeiten zur Manipulation des Kanalproteins bietet, ist die zellfreie Expression, also die Synthese von Proteinen in Zellysaten. Das Prinzip der zellfreien Expression nutzt nur die extrahierte Translationsmaschinerie verschiedener prokaryotischer oder eukaryotischer Zelltypen (Carlson et al., 2012). Ribosomen können zusammen mit den assoziierten Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren sowie relevanten löslichen Bestandteilen wie Transfer-RNS (tRNS) und Aminoacyl-tRNA synthetasen isoliert und *in vitro* mit der kodierenden Nukleinsäure des herzustellenden Proteins vereinigt werden. Je nach System wird *in vitro* transkribierte Ribonukleinsäure (RNS) verwendet und die Translation im zellfreien Extrakt durchgeführt, in gekoppelten Systemen erfolgt auch die Transkription von Desoxyribonukleinsäure (DNS) in Form von Plasmiden oder PCR-Produkten im Reaktionsansatz (Zemella et al., 2015). Die Vorteile der zellfreien Synthese liegen neben der Möglichkeit, für lebende Zellen toxische Proteine herzustellen, in der Zugänglichkeit der Reaktion, die die Verwendung nicht-natürlicher, etwa fluoreszenzmarkierter, spinmarkierter und reaktiver Aminosäurederivate für spektroskopische Untersuchungsmethoden oder den Zusatz von Kofaktoren jederzeit erlaubt (Quast et al., 2014). Zur Expression von Membranproteinen ist im besonderen die Supplementierung mit Detergenzien oder Liposomen interessant, die eine kotranslationale Insertion in Mizellen oder membranähnliche Umgebungen gestattet und so die korrekte Konformation fördern kann (Sachse et al., 2014). Neuere Anwendungen nutzen zellfreie

Systeme zur Expansion des genetischen Codes (Quast et al., 2015b), wie Angenendt et al. (2004) zur parallelen Expression von Proteinbibliotheken in einem Chipformat mit wenigen Nanolitern Volumen, oder zur Modellierung künstlicher Zellen in der synthetischen Biologie (Nishimura et al., 2012). Die zellfreien Expressionssysteme sind heute in diversen Formaten entwickelt, aus denen die für das Zielprotein erfolgreiche Variante ermittelt werden muss.

E. coli-Lysat zeichnet sich durch eine vergleichsweise einfache, gut dokumentierte Herstellung aus, die zu einer weiten Verbreitung in der Erforschung besonders prokaryotischer und löslicher Proteine geführt hat (siehe z.B. Schwarz et al. (2007)), ist aber in seiner Synthesefähigkeit eukaryotischer Proteine –gerade Membranproteine– beschränkt. Der Zusatz von gut tolerierten Detergenzien oder Liposomen oder die Reinigung/Rückfaltung des Proteins aus Präzipitat stellen aber mögliche Abhilfen dar, mit der die Stabilisierung hydrophober, aggregationsgefährdeter Bereiche von Membranproteinen erreicht werden kann (Klammt et al., 2005; Junge et al., 2011; Lyukmanova et al., 2012).

Für die Translation schwierig rekombinant herzustellender eukaryotischer, insbesondere humaner Proteine versprechen eukaryotische 80S-Ribosomenkomplexe in Verbindung mit den entsprechenden tRNS zur Berücksichtigung der abweichenden Codon-Verwendung Erfolg. Kaninchenretikulozytenlysat (engl. *rabbit reticulocyte lysate*, RRL) wird in Verbindung mit endogener DNS schon seit den 1950er Jahren zur Untersuchung von Translation (z.B. Borsook et al. (1952)) und Ubiquitinylierung (Etlinger und Goldberg, 1977) verwendet und kann auch zur Proteinexpression genutzt werden; die Herstellung erfordert jedoch die Euthanasie zahlreicher Ursprungstiere. Weiterhin wurden Ascites-Tumorzelllysate (Mathews et al., 1971), Lysate aus der HeLa-Epithelzelllinie und der Zwerghamster-Ovarialzelllinie (engl. *chinese hamster ovary*, CHO) als eukaryotische Alternativen beschrieben, welche allerdings eine geringe Ausbeute bei deutlich höherem Kulturaufwand liefern und eher speziellen Fragestellungen als der Proteinproduktion dienen. So entwickelten beispielsweise Wakiyama und Yokoyama (2014) zur gezielten Aufklärung der Effekte von RNS-Interferenz durch siRNA (engl. *small interfering RNA*) auf die Translationsregulation ein *Drosophila* S2-Zelllinienextrakt.

Auf der Suche nach besserer Syntheseleistung für heutige Proteomik-Methoden oder Markierungstechniken für die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) wurde auch *Spo-doptera frugiperda*-Insektenzelleextrakt (Stech et al., 2014) und Lysat aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Gan und Jewett, 2014) als mögliches Expressionssystem vorgestellt.

Komoda et al. (2004) übertrugen die bekannte Fähigkeit tierischer Zellextrakte zur Replikation von Virengenen zur Untersuchung eines Pflanzen-RNS-Virus auf ein Lysat aus evakuierten BY-2 Tabakprotoplasten. Erst 2014 wurde von Buntru et al. (2014)

ein optimiertes Protokoll der Lysatbereitung in größerem Maßstab und eigentlichen zellfreien Proteinsynthese veröffentlicht und später zu einem gekoppelten, m^7G -RNS-Kappen-unabhängigen System weiterentwickelt (Buntru et al., 2015). Die Leistungsfähigkeit des Tabakzellextraktes zur Herstellung humaner Proteine wurde von Gengenbach et al. (2018) anhand eines intrinsisch ungeordneten Proteins hervorgehoben, welche sich in bakteriellen Expressionssystemen nicht herstellen lassen. Die propagierte Ausbeute und Eignung für eukaryotische Mehrdomänenproteine motivierten die in dieser Arbeit unternommenen Expressionsversuche mit dem *hTREK2-K2P*-Kanal.

Die Option, Weizen als leicht verfügbares pflanzliches Ausgangsmaterial für die Herstellung eines proteinsynthetisierenden Extraktes zu nutzen, wurde erstmals von Roberts und Paterson (1973) vorgeschlagen und verbreitete sich nach Modifizierung (Erickson und Blobel, 1983) zur Untersuchung von Boten-RNS-Populationen und deren Proteinprodukten und (Prä-)Proformen aus verschiedensten Quellen, darunter Viren, Säuger und Organellen. Die große Spanne der möglichen Syntheseprodukte und die vergleichsweise hohe Ausbeute führte vor allem in den letzten 15 Jahren zur Weiterentwicklung des Systems von der Inkorporation nicht-natürlicher Aminosäuren etwa in Ogawa et al. (2011) bis hin zur Expression hunderter offener Leserahmen mit anschließender biochemischer Testung in automatisierten Hochdurchsatzverfahren (Sawasaki et al., 2004).

Während Disulfide in fast allen Lysaten gebildet werden, finden weitere ko- und posttranslationale Modifikationen nur in humanen Zelllinienextrakten statt (Zusammenfassung in Sachse et al. (2013)). *E. coli*-Lysate führen keine Modifikationen aus, in Weizenkeimextrakten und Retikulozytenextrakten kann Phosphorylierung erfolgen. Insektenzellextrakte sind zu Palmitoylierung, Schnitt von Signalpeptiden und eingeschränkt N-Glykosylierung fähig, allerdings mit abweichenden Glykosylierungsmustern. Um den Signalpeptidschnitt oder die Translokation von sekretorischen oder Membranproteinen in das Endoplasmatisches Retikulum (ER) auch in Retikulozyten- und Weizenkeimextrakten zu untersuchen, ist der Zusatz von Mikrosomen aus Hundeleber- oder -pankreasmembranen gängig.

Die exakte Zusammensetzung zellfreier Extrakte (ausgenommen ein kommerzielles, vollständig rekombinantes prokaryotisches Produkt) ist unbekannt und oft chargenabhängig variabel. Zu jedem Extrakt wurde daher verschiedene Optimierungsarbeit geleistet, um eine hohe, stabile Translationsaktivität sicherzustellen. Die i.d.R. zentrifugationsbasierten Herstellungsverfahren zielen zunächst auf die Entfernung ribosomeninaktivierender Faktoren, die als ricinähnliche Proteine z.B. in Endosperm identifiziert wurden (Madin et al., 2000); dann auf die Beseitigung von RNS-spaltenden Enzymen und anderer lytischer Enzyme etwa aus Vakuolen (Komoda et al., 2004); ferner auf die enzymatische Entfernung endogener Nukleinsäuren und schließlich auf die Konzentration der eigentlichen Translationsmaschinerie, also Ribosomen mit ihren akzessorischen

Proteinen. Zusätzliche Stellglieder der Leistungssteigerung sind der Zusatz eines energieregenerierenden Systems (meist Acetylphosphat/endogene Acetatkinase in *E. coli*-Lysaten oder Kreatinphosphat/Kreatinkinase im Weizenkeimextrakt) und die Verlängerung der Reaktionsdauer durch Nachgabe von RNS und Aminosäuren sowie Dialyse- und Tangentialfluss-Filtrationsverfahren (engl. *Continuous-Exchange*), die zusätzlich inhibierende Nebenprodukte wie Phosphat abführen (z.B. Schwarz et al. (2007)). Insbesondere RNS-Stabilität und -Aufbau werden mit hoher Translationseffizienz in Verbindung gebracht. Neben der Verlängerung der Lebensdauer der RNS, in gekoppelten Systemen auch der DNS durch Reduzierung von Nukleasen trägt die Bildung von Polysomen zur dauerhaften Translation bei (Madin et al., 2004; Liu et al., 2005). Stabilisierende RNS-Sekundärstrukturen werden durch die Vorschaltung von Verstärkerstrukturen meist viralen Ursprungs wie z.B. der Tabakmosaikvirus (TMV) Ω -Sequenz und eine 3'-Polyadenylierung gefördert. Speziell für das Weizenkeimextrakt wurden künstliche Verstärkersequenzen entwickelt (Kamura et al., 2005) und sowohl beschrieben, dass eine m⁷G-RNS-Kappe für eine erfolgreiche Initiation mit Polysomenbildung dann nicht notwendig ist und auch eine Polyadenylierung ohne Effizienzverlust durch einen arbiträren Überhang aus Vektorsequenz ersetzt werden kann (Afonina et al., 2014). Dies erleichtert die Verwendung PCR-basierter Matrizen. Wie auch für das *E. coli*-System beschrieben, kann der Zusatz von Detergenzien oder Liposomen die Synthese von Membranproteinen verbessern (Nozawa et al., 2011).

Zielsetzung Mein Bestreben war, die Möglichkeit einer zellfreien Expression funktionseller K2P-Kaliumkanäle als alternative Herstellungsmethode zu etablieren, um gegenwärtige Limitierungen zellbasierter Methoden zu umgehen und aktuell schwierig untersuchbare Fragestellungen zu ermöglichen. Diese zellfrei hergestellten Kanäle sollten dann in einem künstlichen Membransystem elektrophysiologisch charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim; jetzt Merck KGaA, Darmstadt) und Carl Roth (Karlsruhe) in der erforderlichen Reinheit bezogen, sofern bei den Experimenten nicht anders angegeben. Enzyme für die Molekularbiologie stammten soweit nicht gesondert vermerkt von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) und wurden mit den beigegeführten Puffern verwendet.

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR und Kolonie-PCR Die PCR nach wurde zur zielgerichteten Veränderung von Vektoren, zur Einführung von Punktmutationen, zur Herstellung von Fragmenten für Klonierungen und als Kolonie-PCR zur Überprüfung von Klonen genutzt. Kontrollansätze wurden in 20 μl , Mutagenese-PCR in 50 μl und präparative PCR in 100 μl Reaktionsvolumen durchgeführt.

Eine Reaktionsmischung enthielt 0,025 U μl^{-1} *Pfu*-Polymerase (Promega, Madison, WI, USA), 1 x *Pfu*-Reaktionspuffer (nach Herstellerangaben 20 mM Tris-HCl pH 8,2, 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0,1 % Triton X-100, 0,1 mg ml^{-1} bovines Serumalbumin (BSA)), je 200 μM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und in einigen Fällen 10 % Glycerol. Matrizen-DNS sowie 5'- und 3'-Primer wurden je nach Konstrukt in einer Konzentration von 0,02 ng μl^{-1} bis 1 ng μl^{-1} bzw. zu je 0,05 μM bis 0,1 μM eingesetzt. Im Falle einer Kolonie-PCR wurde ein Kolonieabstrich direkt in das PCR-Röhrchen übertragen.

Primer wurden als entsalzte, lyophilisierte Oligonukleotide bezogen (Eurofins Genomics, Ebersberg) und besaßen nach Bedarf 5'- und 3'-Überhänge mit Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen und kodierenden Sequenzen für Proteaseschnittstellen, Verbindungssequenzen (engl. *linker*) und Proteinmarkierungssequenzen. Zur Suche positiver Klone und Nachweis des gewünschten Inserts vor der Sequenzierung wurden kanalspezifische 5'- und 3'-Primer eingesetzt. Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Primer gibt Tabelle 2.

Die Thermozykler-Reaktion bestand aus der initialen Denaturierung (95 °C, 120 s), 18 bis 30 Zyklen von Denaturierung (95 °C, 30 s), Primerbindung (50 °C bis 58 °C, 30 s bis 45 s) und Extension (72 °C, 120 s je Kilobase Produktlänge) sowie einem finalen Extensionsschritt (72 °C, 300 s) mit anschließender Kühlung auf 4 °C. Nach der Amplifikation wurde die Produktlänge durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert, die Amplifikate wurden über eine Silikasäule oder durch Extraktion nach präparativer Agarose-Gelelektrophorese gereinigt (NucleoSpin, Macherey-Nagel, Düren) und in Reinstwasser (ddH_2O) aufgenommen.

Tabelle 2: Übersicht und Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer. Konsensussequenzen für Restriktionsenzyme sind klein gedruckt.

ID	Name	Sequenz 5'-3'	Beschreibung
<i>Kanalspezifische Primer</i>			
3	<i>h</i> TRAAK_SpeI_for	G CCG act agt ACG ACA GCT	
4	<i>h</i> TRAAK_XhoI_rev	AAT ctc gag CAC CGG CAC	
5	<i>h</i> TREK2b_SpeI_for	G GGG act agt GAG GAT GGA TTT A	
6	<i>h</i> TREK2b_XhoI_rev	CCC ctc gag GTT TCT GTC T	
7	<i>h</i> TALK2_SpeI_for	CCC act agt TAC CGA CCG C	
8	<i>h</i> TALK2_XhoI_rev	TTT ctc gag GCT GTC CTT GC	
15	<i>cp</i> TASK3_SpeI_for	C CCG act agt AAA AAG CAG AAC G	
16	<i>cp</i> TASK3_SalI_rev	AAA gtc gac GAC GGA CTT CCG	
17	<i>r</i> TREK1b_SpeI_for	G TTT act agt CTT GCC AGC GCC	
18	<i>r</i> TREK1b_XhoI_rev	T TGT ctc gag CTT CAT GTT CTC	
19	<i>r</i> TREK1b_ApaI_for	TAT Agg gcc cAA ATG CTT GCC AG	
89	<i>h</i> TREK1b_SpeI_fw	TAT act agt CTT CCC AGC GCC TCG	
90	<i>h</i> TREK1b_XhoI_rv	C GCG ctc gag TTT GAT GTT CTC AAT	
<i>Primer zur Herstellung von Fusionskonstrukten</i>			
47	pEU _{mod} -HA_Xho_fw	A AAT ctc gag GCC GCT TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT TAA AGT CGA CCT GCA GGC	HA-Tag hinter MCS
48	pEU _{mod} -XbaI_rv	T TAG tct aga GGC GAT CGC GTG A	<i>XbaI</i> vor MCS
53	pEU _{mod} -EGFP-C_fw	ACA ctc gag GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGC GTG AGC AAG GGC GAG	<i>XhoI</i> -TEV 5' an GFP
54	pEU _{mod} -EGFP-C_rv	ACA ctg cag TTA AGC GTA ATC TGG AAC ATC GTA TGG GTA CTT GTA CAG CTC GTC	HA-Tag mit 3' Stopp- <i>PstI</i> an GFP
55	NcoI-His_fw	ACT ACA Gcc atg gGA CAT CAT CA	5' <i>NcoI</i> an His-Tags
<i>Sequenzierprimer</i>			
38	<i>h</i> TREK2b_V282I_FW	T CTG ACC ACG ATT GGC TTT GGT G	<i>h</i> TREK2 (intern)
141	SP6_Seq	ATTTAGGTGACACTATAG	pEU _{mod}
122	pFAW3'UTR_far	TTTATTAGGAGCAGATACGAATG	pFAW
123	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	pFAW, pIVEX23w/ pIVEX23wGFPc
124	T7_term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	pEU _{mod} , pIVEX23w/ pIVEX23wGFPc

Mutagenese-PCR Zur Einführung gezielter Punktmutationen wurden komplementäre Primer verwendet, die die abweichende Sequenz etwa mittig enthielten und das gesamte Plasmid amplifizierten ('*Quikchange*'-Methode). Nach Ablauf der PCR wurde die Matrizen-DNS mit dem methylierungsabhängigen Restriktionsenzym *DpnI* verdaut, das Enzym bei 80 °C inaktiviert und 1 µl bis 5 µl der Reaktionsmischung in *E. coli* transformiert. Nach DNS-Isolation aus Einzelklonen wurde die erfolgreiche Mutagenese durch Sequenzierung (Eurofins Genomics, Ebersberg) bestätigt.

2.1.2 Subklonierung

Zur Subklonierung wurden Zielvektoren und PCR-Produkte mit Restriktionsendonukleasen verdaut, nach Bedarf mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, über Silicasäulen oder durch Agarose-Gelextraktion gereinigt und mit Hilfe von 0,5 U ng⁻¹ DNS T4-Ligase im Verhältnis 1:5 nach Herstelleranweisung ligiert. Nach Transformation in *E. coli* wurden positive Klone durch Restriktionsverdau oder Kontroll-PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese ausgewählt und durch Sequenzierung überprüft.

Vektoren für die zellfreie Synthese im Weizenkeimextrakt und im Tabakzellextrakt

Als Ausgangsplasmid diente pEU-HSBCShaker-M356C (Dr. Baron Chanda, Department of Neuroscience, University of Wisconsin-Madison, WI, USA) mit einem Bakteriophage SP6 (SP6)-Promoter und der führenden Sequenz der 5'- nichttranslatierten Region Ω des Tabakmosaikvirus (TMV Ω) als translatorischem Enhancer. Zunächst wurde pEU-HSBC so modifiziert, dass synthetisierte Proteine neben dem aminoterminalen His-Tag zusätzlich einen carboxyterminalen HA-Tag trugen und unerwünschte Schnittstellen entfernt wurden (im Folgenden pEU_{mod}, siehe Abb. 4C). Das Vektorrückgrat von pEU-HSBC wurde durch Primer mit überhängenden Enden so amplifiziert, dass eine *XbaI*-Konsensussequenz vor der ursprünglichen Polyklonierungsstelle (MCS) und die kodierende Sequenz für einen HA-Tag mit *XhoI*-Erkennungssequenz und Stoppcodon hinter der ursprünglichen MCS inseriert wurden. Die Sequenzen der gewünschten K2P-Kanäle wurden mit 5'-*SpeI* und 3'-*XhoI*- (für Kanalsequenzen mit interner *XhoI*-Konsensussequenz *SalI*-) Erkennungssequenzen amplifiziert und anschließend verdaut. Die Fragmente wurden über die kompatiblen *SpeI*- und *XbaI*-Restriktionsschnittstellen mit dem *XbaI/XhoI* geschnittenen Vektorrückgrat ligiert, wobei die *SpeI*- und *XbaI*-Erkennungssequenzen zerstört wurden.

Vektoren für die zellfreie Synthese im *E. coli*-Extrakt Für die zellfreien Synthesen in *E. coli*-Extrakt wurden pIVEX23w und pIVEX23w-GFPc auf der Vektorgrundlage pIVEX2.3 (Roche, Penzberg) verwendet, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Beitz, Pharmazeutisches Institut der CAU, zur Verfügung gestellt wurden. Die

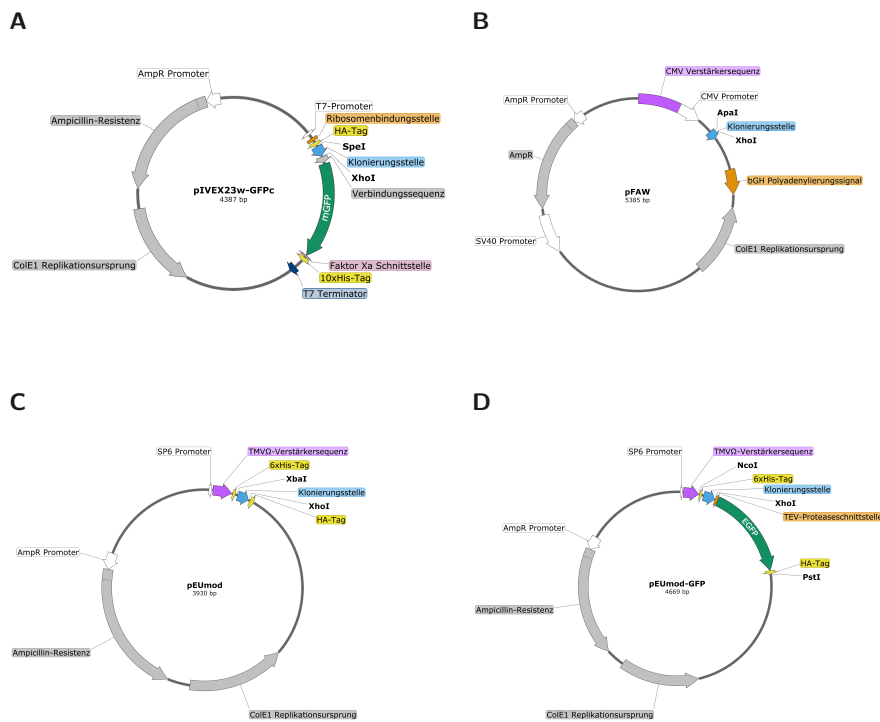


Abbildung 4: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren. A pIVEX23w-GFPc-Vektor für zellfreie Synthesen von GFP-Fusionsproteinen mit His- und HA-Proteinmarkierungssequenzen in *E. coli*-Extrakt. **B** pFAW-Vektor mit CMV-Promoter und Polyadenylierungssignal zur Proteinexpression in HEK 293-Zellen. **C** pEU_{mod}-Vektor mit TMVΩ-Verstärkersequenz für zellfreie Synthesen von Proteinen mit His- und HA-Markierungssequenzen im Weizenkeim- und Tabakzellextrakt. **D** pEU_{mod}-GFP-Vektor für zellfreie Synthesen von spaltbaren GFP-Fusionsproteinen mit TEV-Schnittstelle sowie His- und HA-Proteinmarkierungssequenzen im Weizenkeim- und Tabakzellextrakt.

Vektoren enthielten bereits die codierenden Sequenzen für einen N-terminalen HA- und einen C-terminalen His-Tag bzw. eine C-terminale GFP-Fusion mit His-Tag (Abb. 4A). Sie wurden mit *SpeI* und *XhoI* geschnitten und mit den über PCR mit passenden Restriktionsschnittstellen versehenen Fragmenten der K2P-Kanalsequenzen ligiert.

Konstrukte für den Tobacco Etch Virus (TEV)-Proteolyse-Versuch Für den TEV-Proteolyseversuch wurde ein Fusionsprotein benötigt, das im Linker zwischen den codierenden Sequenzen für *rTREK1* und C-terminalem GFP eine TEV-Proteaseschnittstelle der Aminosäuresequenz ENLYFQG enthält. Zunächst wurde durch Primer mit überhängenden Enden ein GFP-Fragment mit *XhoI*-Restriktionsschnittstelle und codierender Sequenz für die TEV-Proteaseschnittstelle am 5'-Ende sowie der Sequenz für einen HA-Tag, Stoppcodon und *PstI*-Erkennungssequenz am 3'-Ende amplifiziert

und entsprechend verdaut. Ein vorhandenes Konstrukt ohne interne *PstI*-Schnittstelle (pEU_{mod}-*hTWIK1*) wurde mit *XhoI* und *PstI* hinter der kanalkodierenden Sequenz geöffnet und das Fragment mit den TEV-GFP-HA-Sequenzen und Stoppcodon eingesetzt (Abb. 4D). Die kodierenden Sequenzen für *rTREK1* und *hTREK2* wurden mit Primern für 5'-*NcoI*- und 3'-*XhoI*-Erkennungssequenzen inklusive der 5'-His-*Tag*-Sequenz aus den pEU_{mod}-Konstrukten amplifiziert, verdaut und über die *NcoI*- und *XhoI*-Schnittstellen gegen die *hTWIK1*-Kanalsequenz ausgetauscht.

Vektoren für die heterologe Expression in *Xenopus-laevis*-Oocyten Zur Synthese kappentragender RNS für die Technik der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC)-Experimente wurden dieselben Konstrukte von *hTREK2* beziehungsweise *hTREK2*-GFP im pEU_{mod}-Vektor mit Sequenzen für 5'-His-*Tag* und 3'-HA-*Tag* verwendet wie für die zellfreie Expression im Weizenkeimextrakt. Beide Konstrukte zeigten in der TEVC einen großen Strom gleichbedeutend mit hoher Membranexpression und somit war eine Subklonierung in einen gängigen Vektor für die Oocytenexpression nicht notwendig.

Vektoren für die heterologe Expression in HEK 293-Zellen Zur Untersuchung der Membranlokalisierung wurde die für *rTREK1*-GFP kodierende Sequenz in den zur Transfektion von HEK 293-Zellen geeigneten Vektor pFAW (Abb. 4B) mit viralem Cytomegalievirus (CMV)-Promoter subkloniert. Durch PCR wurde unter Auslassung der Sequenz für den N-terminalen Protein-*Tag* eine 5'-*ApaI*-Restriktionsschnittstelle eingeführt und 3' mit einem Sequenzierprimer über die kodierende Sequenz hinaus amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit *ApaI* und *SpeI*, der Vektor wegen einer zweiten vorhandenen *SpeI*-Erkennungssequenz mit *ApaI* und *XhoI* geschnitten. Die gereinigten Fragmente wurden über die kompatible Schnittstelle ligiert und in *E. coli* transformiert.

2.1.3 Transformation und Anzucht von *E. coli* sowie Plasmidpräparation

Nach der Methode von Inoue et al. (1990) chemisch kompetente *E. coli* wurden in Aliquots von 25 µl bis 50 µl für 10 min mit dem benötigten Plasmid inkubiert und durch Hitzeschock (42 °C, 45 s) und anschließende Kühlung auf Eis transformiert. Nach einstündiger Regeneration unter moderatem Schütteln in 0,5 ml SOC-Flüssigmedium wurden die Transformanden über Nacht bei 37 °C auf Luria-Bertani (LB)-Selektionsplatten mit 100 µg ml⁻¹ Ampicillin kultiviert. Für eine Mini-Präparation (zirka 10 µg bis 25 µg DNS-Ausbeute) wurden 5 ml LB-Selektionsmedium mit einer einzelnen Kolonie beimpft, für eine Midi-Präparation (125 µg bis 200 µg Plasmid) 50 ml mit Vorkultur inokuliert und etwa 16 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die DNS-Extraktion erfolgte mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; Promega, Madison, WI, USA) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse und anschlie-

ßenden Reinigung über eine Silikasäule. Die DNS-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und die Größe und Integrität der Plasmide durch Agarose-Gelelektrophorese geprüft.

2.1.4 *In-vitro*-Transkription

Die Transkriptionsreaktion einfacher kodierende RNS (cRNS) ohne 7-Methylguanosin-kappe wurde in Anlehnung an Takai et al. (2010) durchgeführt und enthielt 80 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) pH 7,8, 16 mM Magnesiumacetat, 2 mM Spermidin, 10 mM Dithiothreit (DTT), 1 U μl^{-1} RiboLock RNase-Inhibitor, 1 U μl^{-1} SP6-RNS-Polymerase und 1 $\mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$ Plasmid-DNS. Bakteriophage T7 (T7)-RNS-Polymerase wurde mit dem beigefügten Puffer und derselben Menge DNS verwendet. Die anschließende Reinigung wurde zur Optimierung der Translationsreaktion variiert und umfasste Phenol-Chloroform-Extraktion, Ammoniumacetatpräzipitation oder Lithiumchloridpräzipitation.

Die *in-vitro*-Transkription von cRNS mit 7-Methylguanosin-kappe ($m^7\text{G}$ -RNS) wurde mit Hilfe der AmpliCap-Max T7 bzw. SP6 High Yield Message Maker Kits (Cellscript, Madison, WI, USA) gemäß Herstelleranweisung mit linearisiertem Matrizenplasmid durchgeführt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend einer Phenol-Chloroform-Präzipitation unterworfen und die cRNS in nukleasefreiem ddH_2O aufgenommen. Die Konzentrationen der gereinigten cRNS wurden photometrisch bei 260 nm bestimmt (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Konzentration und Integrität wurden zusätzlich durch Agarose-Gelelektrophorese verifiziert. Die Größe der jeweiligen cRNS ergab sich aus der eingesetzten Matrizen-DNS. Der Vektor pFAW enthielt eine 3'-PolyA-Sequenz und ergab linearisiert mit *MluI* einen 3'-Überhang von etwa 270 bp. Der pEU-Vektor besaß keine Polyadenylierungssequenz und produzierte einen 680 bp-Überhang aus Vektorsequenz bei Verwendung der *HindIII*-Restriktionsschnittstelle.

2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von Nukleinsäuren wurden 0,8 % bis 1 %ige Agarosegele in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE; 40 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), 20 mM Essigsäure, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), pH 8,5) mit Zusatz von Roti-Gelstain in der Verdünnung 1:10 000 (Carl Roth, Karlsruhe) verwendet. Der Ladepuffer für RNS enthielt Formamid zur Denaturierung (Ambion Gel Loading Buffer II, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Nach der Elektrophorese bei konstant 120 mV wurde der Farbstoff unter UV-Licht angeregt, die fluoreszierenden Banden bei 630 nm detektiert (ChemiDoc, Biorad, Hercules, CA, USA) und mit dem Größenstandard (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verglichen.

2.1.6 Reinigung von Nukleinsäuren

Die Reaktionsmischung aus der *in-vitro*-Transkription wurde mit Tris-EDTA-Puffer auf mindestens 100 μl Volumen gebracht, mit einem Volumenäquivalent Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, Carl Roth, Karlsruhe) versetzt, stark geschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation getrennt. Der wässrige Überstand wurde verworfen und verbliebenes Phenol auf gleiche Weise noch zweimal mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Die Nukleinsäuren wurden durch Fällung mit einem Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat, Lithiumchlorid oder Ammoniumacetat versetzt und mit zwei Volumen Isopropanol gefällt. Das Präzipitat wurde in 15 min mit 20 000 g bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit einem Volumen 99 % Ethanol gewaschen. Die Nukleinsäuren wurden etwa 5 min an der Luft getrocknet und in ddH_2O aufgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die Integrität durch Agarose-Gelelektrophorese geprüft.

2.1.7 Kultur und Transfektion von HEK 293-Zellen für die Mikroskopie

HEK 293-Zellen wurden bei 37 °C und 4 % CO_2 in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; 1 g l^{-1} Glukose, 4 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 3,7 g l^{-1} NaHCO_3) versetzt mit 10 % Fötalem Kälberserum, 10 U ml^{-1} Penicillin und 10 mg ml^{-1} Streptomycin (PAN Biotech GmbH, Aidenbach) adhärent in hydrophil beschichteten T75-Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht) gehalten und etwa einmal pro Woche passagiert. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen mit 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA in phosphatgepufferte NaCl-Lösung (PBS) (PAN Biotech GmbH, Aidenbach) in 5 min bei 37 °C abgelöst, die Reaktion durch Zugabe o.a. Mediums gestoppt, die Zellen vereinzelt und etwa $1 \cdot 10^5$ Zellen je Well in einer 24-Well-TC-Flachbodenplatte ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurden die zu 70 % bis 80 % konfluenten Zellen mit 250 ng DNS je Well in serumarmem Medium (OptiMEM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gemäß Herstellerangaben transfiziert. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die transfizierten Zellen am Folgetag erneut trypsinisiert, in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -haltigem PBS gespült und auf sterilisierte, mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen von 10 mm Durchmesser (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) umgesetzt. Nach 12 h bis 24 h Kultivierung wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 15 min mit 4 % Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4 fixiert (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), dieses in 5 min mit 30 mM Glycin in PBS inaktiviert, die Deckgläschen mehrfach in PBS gespült und mit Fluoromount-Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) eingedeckt.

2.2 Biochemische Methoden

2.2.1 Reinigung, Fällung, Konzentrationsbestimmung und Trennung von Proteinen

Affinitätsreinigung von Proteinen Die Reinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Ni^{2+} (IMAC) über die 6xHis-Proteinmarkierungssequenzen der Kanäle. Der Reinigungspuffer enthielt 20 mM Tris, 300 mM NaCl und 0,05 % n-Dodecyl- β -maltosid (DDM). Zur Equilibrierung wurden 10 mM Imidazol, zum Waschen 20 mM Imidazol und zur Elution 300 mM und 500 mM Imidazol zugesetzt. Für die Reinigung der Reaktionsmischungen ohne weiteren Zusatz von Detergenzien aus *E. coli*- und Weizenkeimextrakten wurden diese mit Equilibrierungspuffer auf ein Volumen von zirka 500 μl bis 750 μl gebracht, die DDM-Konzentration auf 0,25 % erhöht und eine Proteaseinhibitormischung (cOmplete EDTA-frei, Roche, Penzberg) zugesetzt. 20 μl bis 50 μl 50 % Ni^{2+} -NTA-Agarose (HisPur, Thermo Scientific Pierce Protein Biology, Waltham, MA, USA) wurden dreimal durch Zentrifugation mit fünf Volumina Equilibrierungspuffer gewaschen (300 g , 2 min, Raumtemperatur) und für 1 h bis 4 h bei 4 °C unter Schütteln mit der verdünnten Reaktionsmischung inkubiert. Für die Inkorporationsversuche in planare künstliche Membranen wurden GUV mit 0,25 %, kleine unilamellare Vesikel (SUV) und Proteoliposomen nach diskontinuierlicher Dichtegradientenzentrifugation mit 0,5 % DDM für 1 h bis 4 h unter Schütteln bei Raumtemperatur oder bei 4 °C solubilisiert und anschließend nach oben beschriebenem Verfahren behandelt (vgl. Abb. 20, Seite 62). Die Ni^{2+} -NTA-Agarose wurde durch Zentrifugation sedimentiert (300 g , 2 min, 4 °C) und unspezifisch gebundenes Protein durch zwei- bis dreimaliges Waschen mit vier Säulenvolumina Waschpuffer entfernt. Anschließend wurden zwei Elutionen mit je einem Säulenvolumen Elutionspuffer steigender Imidazolkonzentration durchgeführt. Zur Analyse durch SDS-PAGE wurden die Eluate ohne Imidazolentfernung verwendet; zur Lagerung, Auftrag auf künstliche Membranen und für die Rekonstitutionsversuche wurde der imidazolhaltige Puffer durch Ultrazentrifugation (Merck-Millipore Amicon Ultra, MWCO 3 kDa, Merck KGaA, Darmstadt) oder Dialyse (Slide-a-Lyzer Mini, Thermo Scientific Pierce Protein Biology, Waltham, MA, USA, MWCO 3,5 kDa) gegen imidazolfreien Reinigungspuffer oder Messlösung getauscht.

Acetonfällung Die zu fällende Probe wurde mit dem vierfachen Volumen gekühlten Acetons (−20 °C) versetzt, heftig geschüttelt und für mindestens 30 min bei −80 °C gelagert. Das Präzipitat wurde bei 20 000 g und 4 °C in 30 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Es wurde unter heftigem Schütteln in Probenpuffer aufgenommen und zur SDS-PAGE verwendet.

Konzentrationsbestimmung Proteinkonzentrationen wurden kolorimetrisch nach dem Prinzip einer chelatkomplex-verstärkten Biuretreaktion bestimmt (Roti-Quant universal, Carl Roth, Karlsruhe). Die Farbreaktionen wurden bei 450 nm im Plattenlesegerät (Genios Pro, Tecan, Männedorf, CH) oder Photometer bei 540 nm (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) quantifiziert und die Proteinkonzentration aus der linearen Regressionsgleichung einer mit BSA aufgenommenen Standardkurve berechnet.

Trennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proben für die SDS-PAGE wurden in reduzierendem Probenpuffer (Laemmli (1970); 62,5 mM Tris pH 6,8, 100 mM Dithiothreitol, 2 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 10 % Glycerol, 0,001 % Bromphenolblau) für 10 min bei 90 °C denaturiert. Sollte die GFP-Fluoreszenz erhalten werden, wurde für 30 min bei 40 °C erwärmt. Zum Größenvergleich wurde ein Proteinstandard aufgetragen (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; Precision Plus Western Blotting Standard; Precision Plus Unstained Protein Standard; beide Biorad, Hercules, CA, USA). 10 % bis 15 %ige diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele wurden von Hand gegossen. Das Sammelgel enthielt 4 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 125 mM Tris pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,1 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 0,01 % N,N,N,N-Tetramethylethylen-diamin (TEMED). Das Trenngel bestand aus 10 % bis 12 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 375 mM Tris pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS und 0,01 % TEMED. Teilweise wurden Acrylamidmischungen verwendet, die einen Fluoreszenzfarbstoff enthielten, der nach UV-Aktivierung kovalent an Proteine bindet und eine direkte Dokumentation ermöglicht (TGX Stain-free, Biorad, Hercules, CA, USA). Als Kathoden- und Anodenpuffer diente eine Lösung aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS (pH 8,3). Die Elektrophorese wurde mit konstant 120 V gestartet, die Spannung nach Einlaufen der Proben in das Trenngel auf 200 V erhöht und die Elektrophorese für etwa 40 min fortgesetzt (Mini-Protean Tetra Elektrodenzelle, Biorad, Hercules, CA, USA).

2.2.2 Proteinfärbungen

Coomassie-Färbung Das Polyacrylamidgel aus der SDS-PAGE wurde unter leichtem Schütteln 15 min in 40 % Ethanol/10 % Essigsäure fixiert und danach in die Coomassie-Lösung aus 0,15 % Coomassie-Brilliantblau R250, 10 % Essigsäure und 40 % Ethanol überführt. Das Gel wurde für mindestens 2 h gefärbt, der Hintergrund anschließend für 2 h bis 4 h in 10 % Essigsäure entfärbt und das Bandenmuster dokumentiert.

Silberfärbung Das Polyacrylamidgel aus der SDS-PAGE wurde zunächst 5 min in 40 % Methanol/10 % Essigsäure, dann 10 min in 10 % Ethanol/15 % Essigsäure fixiert und

5x 1 min bis 2 min in 60 °C heißem deionisiertes Wasser (dH₂O) gewaschen. Es folgte die Reduktion für 30 s in Farmerschem Abschwächer (50 g l⁻¹ K₃[Fe(CN)₆], 100 g l⁻¹ Na₂S₂O₃), welcher durch 6x 1 min bis 2 min Waschen in 60 °C heißem dH₂O entfernt wurde. Anschließend wurde das Gel 12 min mit 0,2 % wässriger AgNO₃-Lösung gefärbt, 90 s in dH₂O gespült und in frischem Entwickler (100 mM Na₂CO₃, 1 mM Formaldehyd) zweimal je etwa 30 s entwickelt, die Reaktion mit einem Überschuss 10 %iger Essigsäure gestoppt und das Gel dokumentiert. Alle beschriebenen Schritte wurden unter leichtem Schütteln durchgeführt und alle silberhaltigen Lösungen wurden gesammelt und gesondert entsorgt.

Ponceaurot-Färbung Zur Transferkontrolle von PAGE-Gel auf die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurde das Totalprotein 5 min mit Ponceaurot (0,1 % PonceauS, 5 % Essigsäure in dH₂O) angefärbt. Nach Entfärbung unter fließendem dH₂O wurde der Western Blot (siehe Abschnitt 2.2.3) fortgesetzt.

2.2.3 Immundetektion von Proteinen (*Western Blot*)

Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur und unter Schütteln. Die hydrophobe PVDF-Membran wurde 1 min in Methanol aktiviert. Membran und Polyacrylamidgel aus der SDS-PAGE wurden für 10 min in Transferpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,01 % SDS, 10 % bis 20 % Methanol) equilibriert. Die Übertragung erfolgte im Naßverfahren bei konstantem Strom von 350 mA für 60 min bis 75 min in der Mini-Protean Tetra Elektrodenzelle (Biorad, Hercules, CA, USA) im Eisbad oder bei 4 °C. Proteinfreie Bereiche der PVDF-Membran wurden in TBST (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,6) mit 3 % Milchpulver (*blotting grade*, Carl Roth, Karlsruhe) für eine Stunde blockiert und diese dreimal 15 min in TBST gewaschen. Die Membran wurde dann für 2 bis 4 Stunden oder bei 4 °C über Nacht mit dem in TBST mit 3 % Milchpulver verdünnten Primärantikörper inkubiert. Nach 3x 15 min Waschen in TBST wurde der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper in TBST mit 3 % Milchpulver für eine Stunde zugegeben, ungebundener Antikörper erneut durch 3x 15 min Waschen in TBST entfernt und die Membran mit Chemilumineszenzsubstrat (ECL Plus, Thermo Scientific Pierce Protein Biology, Waltham, MA, USA) benetzt. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte nach 5 min Inkubation mit Hilfe einer gekühlten CCD-Kamera (ChemiDoc, Biorad, Hercules, CA, USA) und Belichtungszeiten zwischen einigen Sekunden und fünf Minuten.

Tabelle 3: Übersicht verwendeter Antikörper

Antikörper	Art	Nr.	Verdünnung	Quelle
6xHis Epitope Tag (HIS H8)	mouse monoclonal	21315	1 : 1500	Thermo Scientific Pierce Protein Biology, Waltham, MA, USA
TREK1 (E19)	goat polyclonal	sc-11556	1 : 1500	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
HA Epitope Tag (2-2.2.14)	mouse monoclonal	26183	1 : 10 000	Invitrogen, jetzt Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
IgG-HRP-Konjugat	rabbit anti-goat	sc-2768	1 : 10 000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
IgG-HRP-Konjugat	goat anti-mouse	sc-2005	1 : 2500	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA

2.2.4 Herstellung und Verwendung von Liposomen und Proteoliposomen

Reinigung von Asolectin Die Phospholipidmischung Asolectin (Sigma, München) aus Sojabohnen bestand zu je etwa 25 % aus Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylinositol (PI) und wurde zur Entfernung von Verunreinigungen wie Glykolipiden und Anreicherung von PC vor der Herstellung von SUV (siehe nächster Abschnitt) mit Aceton extrahiert. Asolectin wurde in etwa der zehnfachen Masse Chloroform gelöst, mit dem fünffachen Volumen eiskalten Acetons (-20°C) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag erneut mit einem Volumen eiskalten Acetons versetzt und wie oben gerührt. Der Überstand wurde verworfen, die untere Schicht in Glasröhrchen aliquotiert, das Aceton unter Vakuum entfernt und das getrocknete Lipid unter Stickstoff bei -80°C gelagert. Ein solches polares Extrakt hat einen ungefähren Anteil von 45 % PC.

Herstellung und Umpufferung von großen unilamellaren Vesikeln (GUV) GUV wurden durch Elektroformation im VesiclePrep-System (Nanion, München) hergestellt. 10 μl einer frisch angesetzten 5 mM 1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DPhPC)-Lösung in Chloroform wurden auf einem mit Indiumzinnoxid beschichteten Glasplättchen ausgestrichen und das Lösungsmittel unter N_2 entfernt. Ein gefetteter Dichtungsring wurde um den Lipidfilm positioniert, mit etwa 220 μl 1 M Sorbitol in ddH_2O gefüllt und das zweite leitfähige Plättchen mit Pufferkontakt aufgelegt. Ein alternierendes elektrisches Feld von 3 V und 5 Hz wurde bei 30°C für zwei Stunden angelegt, wobei die Spannung an Beginn und Ende über 5 min rampenförmig erhöht bzw. erniedrigt wurde. Anschließend wurde Lösung mit einer Mikropipette entnommen und die Bildung

von GUV lichtmikroskopisch kontrolliert. Für die Verwendung in der zellfreien Synthese musste Sorbitol zu einem möglichst großen Teil entfernt werden, da bei direktem Einsatz des Elektroformationsansatzes keine Proteinsynthese beobachtet wurde. Die GUV-Lösung wurde im Verhältnis 1:2 mit SA-Puffer (siehe Abschnitt 2.3.3) verdünnt, die GUV bei 100 g sedimentiert und das gleiche Volumen des Überstands verworfen. Die GUV wurden noch zwei weitere Male gewaschen und anschließend mikroskopisch kontrolliert. Für die Umpufferung mussten relativ großen Verluste sowie die Reduzierung der durchschnittlichen Größe in Kauf genommen werden.

Herstellung von kleinen unilamellaren Vesikeln (SUV) SUV wurden aus gereinigtem Asolectin oder DPhPC (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) hergestellt. DPhPC wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt. Das Lipid wurde in Chloroform gelöst, in Glasröhrchen mit PTFE-Deckel aliquotiert, das Lösungsmittel unter N_2 evaporiert und das Lipid bei $-80^\circ C$ gelagert. Zur Herstellung von SUV wurde zunächst eine Lipidlösung der Konzentration 10 mg ml^{-1} in Chloroform frisch hergestellt, ein der benötigten Menge Lipid entsprechendes Volumen in einen Methanol/Aceton-gereinigten Rundkolben überführt und das Lösungsmittel durch Schwenken unter N_2 -Strom evaporiert, so dass ein klarer Lipidfilm zurückblieb. Restliches Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt, das Lipid ad 50 mg ml^{-1} bis 100 mg ml^{-1} mit Reaktionspuffer der zellfreien Synthese (SA-Puffer) oder ddH_2O unter N_2 für eine Stunde bei Raumtemperatur hydratisiert und anschließend unter heftigem Schütteln vollständig suspendiert. Die Suspension aus multilamellaren Lipidaggregaten wurde durch etwa einstündige Sonifizierung im gekühlten Ultraschallbad (Sonorex RK52, Ultraschall-Spitzenleistung 120 W, Bandelin, Berlin) oder je elffache Extrusion durch 250 nm und 100 nm Polycarbonat-Membranfilter (Avanti Mini Extruder, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) in SUV überführt. Eine engere Verteilung der Teilchengröße um 100 nm war beim Extrusionsverfahren gegeben. Für die zellfreie Synthese funktionierten beide Varianten, so dass meist die Sonifizierung eingesetzt wurde.

Herstellung und Isolierung von Proteoliposomen In dieser Arbeit wurden verschiedene Formen von Liposomen direkt aus der zellfreien Synthese isoliert. Umgepufferete GUV wurden unverdünnt eingesetzt und nach der Reaktion für die konfokale Mikroskopie vorbereitet (siehe Abschnitt 2.4). SUV wurden mit einer Endkonzentration von 100 mg ml^{-1} für Asolectin und 50 mg ml^{-1} für DPhPC in nukleasefreiem ddH_2O hergestellt und der zellfreien Reaktion in einer Endkonzentration von $4,5\text{ mg ml}^{-1}$ bis 5 mg ml^{-1} in Reaktions- und Versorgungsmischung zugegeben. Sie lieferten die kleineren Proteoliposomen für die elektrophysiologischen Untersuchungen. Nach Abschluss der zellfreien Synthese wurden die Proteoliposomen durch mehrere Zentrifugationen bei

4 °C abgetrennt. Zunächst wurde die Reaktionsmischung für 10 min bei 10 000 *g* von Präzipitat befreit. Der Überstand wurde auf einen diskontinuierlichen Dichtegradienten (35 %, 20 %, 10 % und 0 % Sucrose in PBS) geschichtet und für 4 h bei 100 000 *g* zentrifugiert (Optima XL 100K mit Ausschwingrotor Ti28.38, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Der Gradient wurde fraktionierend abgesaugt und die proteoliposomenhaltige Fraktion mit Messlösung verdünnt. Die Proteoliposomen wurden bei 100 000 *g* in einer Stunde pelletiert, auf gleiche Weise noch zweimal gewaschen und in Messlösung resuspendiert.

TEV-Proteolyseversuch *r*TREK1-GFP-Proteoliposomen aus einer zellfreien Expression im Weizenkeimextrakt mit Zusatz von GUV wurden mit 0,1 U μl^{-1} ProTEV Protease (Promega, Madison, WI, USA) gemischt und sofort eine Probe als Nullwert entnommen. Die Reaktionsmischung wurde bei 30 °C inkubiert und für 3 h stündlich sowie nach Inkubation bei 4 °C über Nacht (15h) weitere Proben entnommen. Die Proben wurden direkt nach Entnahme 10 min bei 20 000 *g* und 4 °C zentrifugiert, Pellet und Überstand getrennt, für 30 min in Lämmli-Puffer denaturiert und bei –20 °C gelagert. Nach der SDS-PAGE wurde die Fluoreszenz der Gelbanden bei 520 nm dokumentiert (ChemiDoc, Biorad, Hercules, CA, USA).

ATR-Spektroskopie Die Aufnahme der Abgeschwächte Totalreflexion (engl. *attenuated total reflectance*)-Fourier-Transform-Infrarotspektren wurde von Dr.ⁱⁿ Ekaterina Zaitseva im Physiologischen Institut II der Universität Freiburg durchgeführt. Eine Probe von <1 μl der proteinhaltigen GUV wurde auf das Probenglas des ATR-Elements (Bruker, Billerica, MA, USA) aufgebracht, zu einem dünnen Film getrocknet und die wellenlängenabhängigen Absorptionsintensitäten gemessen. Das Verhältnis der relativen Absorptionsintensitäten der Ester-Carbonyl-Streckschwingungen von Lipid bei etwa 1700 cm^{-1} bis 1750 cm^{-1} und der Amid-I-Bande von Protein bei etwa 1550 cm^{-1} bis 1650 cm^{-1} gab Aufschluss über das relative (spektroskopische) Lipid-zu-Protein-Verhältnis (Navarro et al., 1984).

2.3 Zellfreie Expression

2.3.1 Zellfreie Expression im *E. coli*-Extrakt

Herstellung des *E. coli*-Extrakts Die Extraktherstellung aus *E. coli* wurde am Pharmazeutischen Institut der CAU Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Beitz mit Dr.ⁱⁿ Sinja Bock nach dem in Schwarz et al. (2007) beschriebenen Protokoll durchgeführt. Ein 5l-Fermenter (Biostat, Sartorius-Stedim Biotech S. A., Göttingen) mit 2x YPTG-Medium wurde mit einer frischen Vorkultur von *E. coli* BL 21 beimpft. Die Fermen-

tation wurde unter O_2 -Begasung und starkem Rühren durchgeführt und das exponentielle Wachstum turbidimetrisch überwacht. Bei Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm von 2,5 wurde die Kultur im Eiswasserbad in 40 min auf unter $12\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Sie wurden zweimal in auf $4\text{ }^\circ\text{C}$ vorgekühltem S30 A-Puffer (10 mM Tris-acetat pH 8,2, 14 mM Magnesiumacetat, 0,6 mM KCl; 6 mM 2-Mercaptoethanol) gewaschen und im 1,1-fachen Pelletvolumen S30 B-Puffer (10 mM Tris-acetat pH 8,2, 14 mM Magnesiumacetat, 0,6 mM KCl; 1 mM Dithiothreit und 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid) resuspendiert. Nach Zellaufschluss durch zwei Passagen im French Pressure Cell Disruptor (Thermo Fischer Scientific Germany, Bonn) bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und 20 000 *psi* aufgeschlossen. Zelltrümmer und aufschwimmende Lipide wurden durch zweimalige Zentrifugation entfernt (30 000 *g*, 30 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$), der Überstand ad 400 mM mit NaCl versetzt und 45 min bei $42\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Das Extrakt wurde bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht gegen S30 C-Puffer (10 mM Tris-acetat pH 8,2, 14 mM Magnesiumacetat, 0,6 mM Kaliumacetat; 0,5 mM Dithiothreit) dialysiert, Präzipitat durch eine weitere Zentrifugation entfernt und Aliquots in $N_2(l)$ schockgefroren. Vor Verwendung wurde die ideale Magnesiumkonzentration der Charge (meist im Bereich von 12 mM bis 14 mM) durch Testsynthesen von GFP festgestellt.

Zellfreie Synthese im *E. coli*-Extrakt Die Reaktionen wurden im Dialysemodus mit Trennung von Reaktions- und Versorgungsmischung durch eine Dialysemembran durchgeführt und für 16 h bis 18 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Zusammensetzung einer zellfreien Synthesereaktion gibt Tabelle 4 an. Der S30-CFE-Puffer enthielt 10 mM Tris-acetat pH 8,2, 14 mM Magnesiumacetat und 0,6 mM Kaliumacetat.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Synthesereaktion im *E. coli*-Extrakt

Mastermix			Versorgungsmischung		
NaN ₃	0,05	%	Mastermix		
Polyethylenglycol 8000	2	%	Aminosäuremix	0,5	mM
KOAc	130	mM	S 30-CFE	0,4	x
Mg(OAc) ₂	7,1	mM			
HEPES	104	mM	Reaktionsmischung		
EDTA	0,83	mM	Mastermix		
Proteaseinhibitor	1	x	Pyruvatkinase	0,08	mg ml ⁻¹
Folsäure	0,1	mg ml ⁻¹	<i>E. coli</i> tRNA	0,7	mg ml ⁻¹
Dithiothreit	2	mM	T7-RNS-Polymerase	15	U µl ⁻¹
ATP	4,8	mM	RiboLock	0,3	U µl ⁻¹
GTP, CTP, UTP	je 3,2	mM	Plasmid	0,023	mg ml ⁻¹
Phosphoenolpyruvat	20	mM	S 30-Extrakt	0,35	x
Acetylphosphat	20	mM			
Aminosäuremix	0,5	mM			
Aminosäuren RCWME	1	mM			

2.3.2 Zellfreie Expression im BY 2-Tabakzelleextrakt

Herstellung des BY 2-Tabakzelleextrakts Die Herstellung des zellfreien Tabakextraktes wurde mit Dr. Sebastian Krossa in der Arbeitsgruppe von Prof. Scheidig am Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie der CAU Kiel nach Buntru et al. (2014, 2015) durchgeführt. BY 2-Tabakzellen wurden in einem 10l-Fermenter in Murashige-Skoog-Medium supplementiert mit 3% (w/v) Sucrose, 1 mg l⁻¹ Thiamin, 0,2 mg l⁻¹ 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, 100 mg l⁻¹ *myo*-Inositol, 250 mg l⁻¹ KH₂PO₄ und Pluronic Antischaummittel (alle Reagenzien Sigma-Aldrich, Steinheim) bei 26 °C angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet. Die Zellwände wurden durch eineinhalbstündige Inkubation mit dem zehnfachen Zellvolumen 3% (v/v) Rohament CL und 0,2% (v/v) Rohapect UF (AB Enzymes, Darmstadt) in 3,6 g l⁻¹ Kao und Michayluk Basalsalz, 360 mM Mannitol, 1 mg l⁻¹ 6-Benzylaminopurin und 0,5 mg l⁻¹ 1-Naphtylessigsäure bei 27 °C verdaut. Die Protoplasten wurden durch Zentrifugation (300 g, 10 min) abgetrennt, zweimal in 200 mM MgCl₂/50 mM PIPES-KOH pH 7,4 gewaschen und zur Evakuolierung auf einen diskontinuierliche Dichtegradienten (0%, 15%, 30%, 40% und 70% Percoll in MgCl₂/PIPES-KOH) geschichtet. Nach Zentrifugation (12000 g, 90 min, 25 °C) wurden die Protoplasten an der Grenzschicht 40%/70% entnommen, in 30 mM HEPES-KOH pH 7,4, 60 mM Kaliumglutamat, 0,5 mM Magnesiumglutamat, 2 mM Dithiothreit mit Proteaseinhibitor (cComplete-Tabletten EDTA-frei, Roche, Penzberg) gewaschen und durch N₂-Dekompression (160 bar,

15 min; Parr Instrument Company, Moline, IL, USA) aufgeschlossen. Nach Abtrennung von Zellkernen und intakten Zellen durch Zentrifugation (500 *g*, 10 min, 4 °C) wurden 0,5 mM Kalzium zugegeben und endogene Nukleinsäuren durch 7,5 U ml⁻¹ Nuklease S7 bei Raumtemperatur verdaut. Die Reaktion wurde durch 2 mM EDTA gestoppt, das Lysat in N₂(*l*) schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Synthese wurde *in vitro* transkribierte RNS mit und ohne 7-Methylguanosinkappe mit der bei den Ergebnissen angegebenen Reinigungsmethode verwendet. Die Reaktionsmischung enthielt nach Buntru et al. (2014) die in Tabelle 7A angegebenen Komponenten. Die Zusammensetzung der Reaktion im gekoppelten System (Buntru et al., 2015) ist entsprechend in Tabelle 7B aufgelistet. Beide Translationsansätze wurden für 18 h bei 25 °C unter Schütteln inkubiert.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Synthesereaktionen im Tabakzellextrakt.

A Ungekoppelte Translationsreaktion			B Gekoppelte Transkriptions-Translations-Reaktion		
RNS	60	ng µl ⁻¹	Plasmid	80	ng µl ⁻¹
Tabakzellextrakt	30	%(<i>v/v</i>)	Tabakzellextrakt	40	%(<i>v/v</i>)
HEPES-KOH pH 7,6	9	mM	HEPES-KOH pH 7,8	40	mM
Kaliumacetat	85	mM	Magnesiumglutamat	8,5	mM
Magnesiumacetat	1,44	mM	Kreatinphosphat	30	mM
Dithiothreit	0,6	mM	Kreatinkinase	50	µg ml ⁻¹
ATP	0,75	mM	T7-RNAP	50	ng µl ⁻¹
GTP	0,1	mM	ATP	3	mM
Aminosäuremischung	je 50	µM	GTP	1,2	mM
Spermin	80	µM	CTP	1,2	mM
Kreatinphosphat	25	mM	UTP	1,2	mM
Kreatinkinase	0,2	mg ml ⁻¹			
RNase-Inhibitor	40	U µl ⁻¹			

2.3.3 Zellfreie Expression im Weizenkeimextrakt

Die Synthesereaktionen wurden in Anlehnung an Takai et al. (2010) und Herstelleranweisung im Schichtverfahren mit WEPRO 1240H (CellFree Sciences, Ehime, Japan) und dem mitgelieferten SA-Puffer (30 mM HEPES-KOH pH 7,6, 100 mM Kaliumacetat, 2,7 mM Magnesiumacetat, 0,4 mM Spermidin, 2,5 mM DTT, 0,3 mM je Aminosäure, 1,2 mM ATP, 0,25 mM GTP, 16 mM Kreatinphosphat) durchgeführt. Die Reaktionsmischung (Tabelle 9A) enthielt alle zur Translation erforderlichen Komponenten, der darüber geschichtete Versorgungspuffer (Tabelle 9B) lieferte Energiesubstrate

Tabelle 8: Zusammensetzung der Synthesereaktionen im Weizenkeimextrakt.

A Reaktionsmischung			B Versorgungspuffer		
RNS	1	$\mu\text{g ml}^{-1}$	SA-Puffer	1	x
WGE	50	$\%(v/v)$	SUV	5	mg ml^{-1}
SA-Puffer	1	x			
Kreatinkinase	0,2	mg ml^{-1}			
SUV	5	mg ml^{-1}			

und Aminosäuren nach bzw. diente der Ausverdünnung translationsinhibierender Reaktionsprodukte wie z.B. anorganisches Phosphat. Kreatinkinase aus Kaninchenmuskel stammte von Roche (Penzberg). Modifizierungen des Protokolls sind bei den Experimenten beschrieben; nach Optimierung wurden die Synthesen unter Zusatz von 5 mg ml^{-1} Asolectin-SUV durchgeführt und für 18 h bis 20 h bei 18°C inkubiert.

2.4 Fluoreszenzmethoden

2.4.1 Quantifizierung der GFP-Gesamtfluoreszenz

Zur Überprüfung einer erfolgreichen zellfreien Synthese und zur Verfolgung der Reaktionsverläufe von GFP-Fusionsproteinen wurde die Fluoreszenz der Reaktionsmischung in einer 96-Well-Platte im Plattenlesegerät bei 22°C aufgenommen (Genios Pro, Tecan, Männedorf, CH). Anregung und Detektion erfolgten mit einem Fluorescein-Filtersatz bei 458 nm und 535 nm gemittelt über fünf Lichtblitze pro Probe und einer Integrationszeit von 100 μs . Die notwendigen Verstärkungseinstellungen (*Gain* 61 bis 96) wurden zu Anfang angepasst und über das Experiment hinweg beibehalten, so dass vergleichbare Daten in Relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) erhalten wurden.

2.4.2 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Die Fluoreszenz von GFP-Fusionsproteinen in Membranen wurde durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie dokumentiert (LSM 510 META mit Inversmikroskop Axiovert 200, Carl Zeiss Microscopy, Jena). GFP wurde mit Hilfe eines Argonlasers mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission mit einem Bandpassfilter bei 505 nm bis 530 nm durch ein *Pinhole* von 1 bis 2,3 AU mit einem Photomultiplier detektiert. Zusätzlich wurde ein Durchlichtbild in Phasenkontrast- oder Differenzialinterferenzkontrast (DIC)-Technik aufgenommen. Alle Aufnahmen wurden im linearen Detektorbe-

reich ausgeführt, über vier Abtastzyklen gemittelt und sind ohne Hintergrundsubtraktion dargestellt.

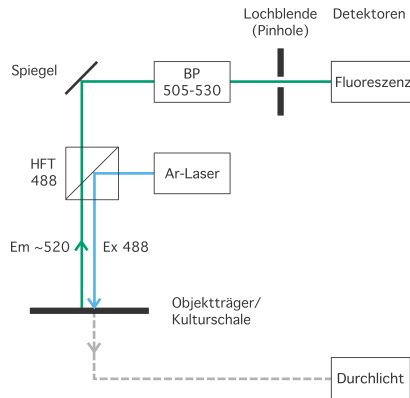


Abbildung 5: Konfiguration des konfokalen Mikroskops für Fluoreszenzaufnahmen. HFT, Hauptfarbteiler; Ex, Anregung; Em, Emission, BP, Bandpassfilter; Wellenlängenangaben für Anregung, Emission und Filter in nm.

Xenopus-laevis-Oocyten wurden einer 35 mm-Glasbodenschale (μ Dish, ibidi GmbH, Martinsried) in Testlösung (11C) mikroskopiert (Achromplan LD PH2, 20x0,4 korr.). GUV wurden in einer Kammer aus Deckgläsern und einem Abstandshalter aus Silikon, versiegelt mit einer biologisch inerten Vaseline-Lanolin-Paraffin-Mischung (VALAP) in Beobachtungspuffer (100 mM KCl, 10 mM HEPES, 200 mM Glukose, pH 7,4) aufgenommen (Objektive Neofluar 40x 1,3 und A-Plan Neofluar 100x 1,45). Fixierte HEK 293-Zellen (siehe Abschnitt 2.1.7) wurden ebenfalls unter 400-facher Vergrößerung mikroskopiert.

2.4.3 Fluoreszenzdetektion im SDS-Polyacrylamidgel

Die Fluoreszenz von GFP bzw. GFP-Fusionsproteinen im Polyacrylamidgel wurde durch blaues LED-Auflicht angeregt und die Emission mit einer CCD-Kamera aufgenommen (ChemiDoc mit epi-blue LED-Modul und SYBR-Green-Filtersatz 530/28 nm, Biorad, Hercules, CA, USA). Bei Verwendung von UV-aktivierbaren *stain-free*-Gelen wurde zunächst die GFP-Fluoreszenz detektiert, der photoreaktive Farbstoff dann für 1 min unter UV-Licht aktiviert und zur Darstellung von Marker und Gesamtprotein erneut ein Bild aufgenommen.

Tabelle 10: Zusammensetzung von Lösungen zur Oocytenpräparation und -lagerung

A OR 2	B ND 96	C Testlösung
mM	mM	mM
NaCl	NaCl	NaCl
82,5	96	54
KCl	KCl	KCl
2	2	30
MgCl ₂	CaCl ₂	CaCl ₂
1	1,8	0,41
HEPES	MgCl ₂	Ca(NO ₃) ₂
5	1	0,33
	HEPES	MgSO ₄
	5	0,82
pH 7,5 mit NaOH	pH 7,4 mit NaOH/HCl	NaHCO ₃
		2,4
		Tris
		7,7
		Penicillin
		100 U ml ⁻¹
		Streptomycin
		100 µg ml ⁻¹
		pH 7,4 mit NaOH/HCl

2.5 Elektrophysiologische Methoden

2.5.1 Messungen an *Xenopus-laevis*-Oocyten

Adulte weibliche Krallenfrösche der Art *Xenopus laevis* aus der Zucht von NASCO (Fort Atkinson, WI, USA) wurden in der Tierhaltung der CAU gemäß den Vorgaben der Tierschutz-Versuchstierverordnung gehalten. Einige Kubikzentimeter Ovarialgewebe wurden unter Tricain-Narkose (0,2% in 50 mM NaHCO₃) und Eiskühlung chirurgisch entnommen, die Wunde mit resorbierbarem Nahtmaterial (Glycolon, Resorba Medical GmbH, Nürnberg) verschlossen und die Krallenfrösche nach Abklingen der Narkose in die Haltung zurückgegeben. Die Tiere wurden in der Regel für 5 bis 6 Entnahmen verwendet, bevor sie euthanasiert wurden.

Oocytenisolation und RNS-Injektion Das Ovarialgewebe wurde zerteilt und die Oocyten zur Vereinzelung mit 2 µg ml⁻¹ Kollagenase Typ II (Biochrom GmbH, Berlin) in OR 2-Lösung (Tabelle 11A) eine Stunde bei Raumtemperatur verdaut. Das Enzym wurde durch mehrfaches Waschen in ND 96-Puffer (Tabelle 11B) eliminiert und die Oocyten bis zur Verwendung bei 17 °C gelagert.

Zur heterologen Proteinexpression wurden die Oocyten in frische ND 96-Lösung überführt und die Follikelschicht von Hand entfernt. Zur Herstellung der Injektionspipetten wurden Glaskapillaren mit einem Mikropipetten-Puller (Sutter Instrument P-1000, Novato, CA, USA) fein ausgezogen und an einem Platinfilament scharf gebrochenen. Etwa 50 nl cRNS des gewünschten Kanals in Konzentrationen von 2,5 ng µl⁻¹ bis 5 ng µl⁻¹

wurden unter mikroskopischer Kontrolle in Oocyten der Entwicklungsstufe VI nach Dumont (1972) injiziert und für 24 bis 48 Stunden bei 17 °C in Testlösung (Tabelle 11C) inkubiert.

Technik der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) Der in Abb. 6 dargestellte Versuchsaufbau bestand aus einer hausgefertigten Messkammer mit Applikationssystem, Mikromanipulatoren, Stereomikroskop, und Verstärker mit Vorverstärkern (iTEV, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz). Die Versuchskammer mit Oocytenmulde und Zu- und Abfluss war zur Superfusion der Oocyte mit den unterschiedlichen Badlösungen über einen Verteiler mit dem schwerkraftgetriebenen Applikationssystem sowie einer Absaugpumpe verbunden. Die Vorverstärker mit der chloridierten Potenzial- bzw. Stromelektrode und den Pipettenhaltern waren auf Mikromanipulatoren montiert, wobei die Potenzialelektrode mit der als Silberpellet ausgeführten Referenzelektrode im Bad verbunden war. Alle Komponenten waren sternförmig geerdet. Die Kontrolle der Verstärker- und Filtereinstellungen, der Messprotokolle sowie die Digitalisierung der Messdaten erfolgte am Rechner mit Hilfe des Programms Patchmaster (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz). Pipetten wurden mit einem Mikropipetten-Puller (Sutter Instrument P-1000, Novato, CA, USA) aus Borosilikatglaskapillaren (1,16 mm Innendurchmesser, 2 mm Außendurchmesser; Science Products GmbH, Hofheim) gezogen, an einem Platinfilament auf eine Größe entsprechend einem Pipettenwiderstand von 0,5 M Ω bis 1 M Ω scharf gebrochen und mit 2 M KCl gefüllt. Nach Kompensation möglicher Potenzialunterschiede zwischen den Elektroden wurden die Pipetten unter mikroskopischer Kontrolle in die Oocyte eingestochen und —sofern die Oocyte nach Beurteilung von Umkehrpotenzial und Leckstrom in ND96 pH 7,4 geeignet erschien —die Messung begonnen. Alle Messungen fanden bei Raumtemperatur (etwa 21 °C) statt. Als Badlösung diente ND 96 (Tabelle 11B), in die am Messtag Rutheniumrot aus einer Vorratslösung von 10 mM in ddH₂O bzw. 2-APB aus einer Vorratslösung von 300 mM in Dimethylsulfoxid (DMSO) verdünnt wurde. Die verwendeten Konzentrationen sind bei den Experimenten angegeben. 3,3 % DMSO als höchste Lösungsmittelkonzentration führt bei einer Applikationszeit unter 10 s nicht zur Aktivierung an Oocyten (Beltrán et al., 2013). ND 96 pH 6 wurde mit HCl eingestellt.

Das Haltepotenzial lag für alle Messungen bei -80 mV. Im Stufenprotokoll (Abb. 6D) zur Testung der Strom-Spannungs-Beziehung wurde die Spannung in 20 mV-Schritten mit einer Pulsdauer von 300 ms von -100 mV auf $+60$ mV erhöht. Aktivierungen und Inhibition wurden in Rampenprotokollen (Abb. 6C) von -100 mV bis $+40$ mV bei 1 s Rampendauer verfolgt. Die Ströme wurden mit 10 kHz und 2,9 kHz 8-Pol-Bessel-Tiefpassfiltern in Reihe gefiltert und mit einer Abtastfrequenz von 10 kHz digitalisiert. Die Messdaten wurden mit Fitmaster (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lam-

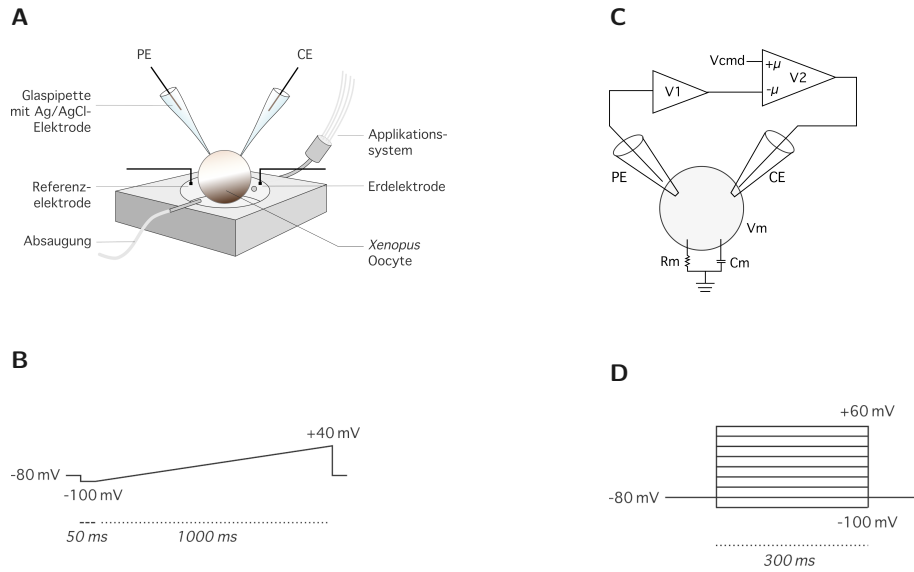


Abbildung 6: *hTREK2*- und *hTREK2*-GFP-Ströme gemessen an *Xenopus*-Oocyten. **A** Aufbau der TEVC-Messkammer mit Strom- (CE) und Potenzelektrode (PE), Erdung und Referenzelektrode sowie Applikationssystem. **B** Das Rampenprotokoll bestand aus einem Sprung zu -100 mV für 50 ms gefolgt von einer Rampe zu $+40$ mV von 1 s Dauer. **C** Ersatzschaltbild der TEVC-Methode. Die Oocytenmembran stellt einen parallelen Schaltkreis aus Kondensator der Kapazität C_m und Membranwiderstand R_m dar. Der Potenzialunterschied zwischen PE und Referenzelektrode als Messerde wird über den Vorverstärker V1 verstärkt und durch den Differenzverstärker V2 erfasst. Das Messpotenzial V_m wird durch Strominjektion der Steuerspannung V_{cmd} über CE eingestellt, so dass die Differenz von Ein- und Ausgang ($+\mu/ -\mu$) Null ist. **D** Stufenprotokoll von -100 mV bis $+60$ mV in 20 mV-Inkrementen mit 300 ms Dauer und Haltepotenzial von -80 mV.

brecht/Pfalz) ausgewertet und die Daten \pm Standardfehler in IgorPro dargestellt. Alle Messungen sind so abgebildet, dass positive Werte den K^+ -Strom von Seiten der höheren Konzentration zur Seite der niedrigeren Konzentration bedeuten, in der TEVC unter physiologischen Bedingungen also Auswärtsströme. Die relativen Aktivierungen und Inhibitionen wurden als Anteile des Grundstroms I_0 ausgedrückt:

$$\text{Relative Aktivierung (\%)} = \frac{I}{I_0} \cdot 100$$

$$\text{Relative Inhibition (\%)} = \left(1 - \left(\frac{I}{I_0}\right)\right) \cdot 100$$

Die Berechnung des exzitatorische halbmaximale Konzentration (EC_{50}) basiert auf

einer Hill-Kurve mit c , Aktivatorkonzentration und n , Hill-Koeffizient:

$$I = I_{max} \cdot \frac{c^n}{EC_{50}^n + c^n}$$

Die relative Aktivierung wurde gegen die logarithmierte Aktivatorkonzentration aufgetragen und eine Kurvennäherung mit vier Koeffizienten durchgeführt.

Die statistische Prüfung bestand aus Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung, F -Test auf Gleichverteilung der Varianzen und ungepaartem t -Test gegen die TREK2-Wildtypkontrolle ($p_\alpha=0,05$).

2.5.2 Patch-Clamp-Messungen an GUV und unilamellaren Blasen

Der Versuchsanordnung bestand aus einem Standard-*Patch-Clamp*-Aufbau mit Mikro-manipulatoren, Mikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss, Jena), Verstärker mit Vorverstärkern (EPC-10, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz) und Isolations-tisch. Alle Komponenten befanden sich in einem Faradaykäfig und waren sternförmig geerdet. Die Kontrolle der Verstärker- und Filtereinstellungen, der Messprotokolle sowie die Digitalisierung der Messdaten erfolgte am Rechner mit Hilfe des Programms Patch-master (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz). Pipetten wurden mit einem Mikropipetten-Puller (Sutter Instrument P-1000, Novato, CA, USA) aus Borosilikatglaskapillaren (1,05 mm Innendurchmesser, 0,5 mm Außendurchmesser; Science Products GmbH, Hofheim) gezogen und ohne weitere Politur mit Messlösung (200 mM KCl, 5 mM HEPES pH 7,4) gefüllt. 2 μ l bis 5 μ l proteinhaltige GUV wurden in Messlösung verdünnt und sanken in 5 min bis 10 min auf das Deckglas der Messkammer ab. Nach Kompensation möglicher Potenzialunterschiede wurden GUV in der Ganzzellkonfiguration gemessen. Alternativ wurden 2 μ l bis 5 μ l GUV in kleinen Tropfen auf das Deckglas aufgebracht, leicht antrocknen lassen und mit hyperosmolarer magnesiumhaltiger Badlösung (200 mM KCl, 5 mM HEPES pH 7,2, 40 mM MgCl₂; nach Brohawn et al. (2014)) überschichtet. Die nach 10 min bis 15 min entstandenen unilamellaren Blasen wurden wie oben gemessen. Zur weiteren Verdünnung mit Lipid wurden die GUV teilweise auf zuvor auf dem Deckglas getrocknete Lipidfilme aus DPhPC in Chloroform oder DPhPC-SUV aufgebracht. Alle Messungen fanden bei Raumtemperatur (etwa 21 °C) statt. Die Ströme bei Haltepotenzialen von -80 mV bis $+40$ mV wurden mit 10 kHz und 2,9 kHz Bessel-Tiefpassfiltern gefiltert, mit einer Abtastrate von 20 kHz aufgezeichnet und zur Darstellung mit 1 kHz gefiltert.

2.5.3 Messungen an planaren künstlichen Membranen

Es kamen zwei verschiedene Systeme zur Messung an planaren Membranen zum Einsatz. Beim Port-a-Patch-System (Nanion Technologies, München; siehe auch Abb. 25A,

Abschnitt 3.5, Seite 69) wird die Pipette der klassischen Patch-Clamp-Technik durch ein Glasplättchen mit einer etwa $1\ \mu\text{m}$ großen Apertur ersetzt, an deren Rändern sich wie an der Pipettenöffnung die hochohmige Verbindung (engl. *seal*) zwischen Glas und Membran bildet. Auf beiden Seiten des Glasplättchens wurde ein Tropfen von je $15\ \mu\text{l}$ Messlösung über der Apertur abgesetzt und das Plättchen montiert. In diese Tropfen tauchte von unten die Ag/AgCl-Messelektrode, die zum Vorverstärker innerhalb des Faraday-Gehäuses führte, und von oben kontaktierte die Referenzelektrode, die über das Gehäuse mit der abgeschirmten Erdung verbunden war. Nach Kompensation von Potenzialunterschieden zwischen den Elektroden wurde im Gehäuse durch eine externe Pumpe ein Unterdruck von $-5\ \text{mbar}$ bis $-20\ \text{mbar}$ angelegt und $2\ \mu\text{l}$ bis $5\ \mu\text{l}$ GUV in die obere Messlösung gegeben. Sank ein GUV nahe der Apertur auf das Glasplättchen, wurde es angesogen, brach auf und die Lipiddoppelschicht legte sich unter Bildung des *Seals* über die Apertur. Nun wurden Proteoliposomen zugegeben, welche eventuell mit der Membran fusionierten und zur Kanalinsertion führten. Die Kontrolle der Messparameter und die Aufzeichnung der Ströme erfolgte über einen EPC-10-Verstärker mit dem Programm Patchmaster (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz). Die Ströme bei Haltepotenzialen von $-80\ \text{mV}$ bis $+80\ \text{mV}$ wurden mit $10\ \text{kHz}$ und $2,9\ \text{kHz}$ Bessel-Tiefpassfiltern gefiltert, mit einer Abtastrate von $20\ \text{kHz}$ aufgezeichnet und zur Darstellung mit $1\ \text{kHz}$ gefiltert.

Das Orbit 16-System (Nanion Technologies, München; siehe auch Abb. 25B, Abschnitt 3.5, Seite 69) arbeitet mit einem Glas-Polymerchip, in den 16 Mikrokavitäten mit $50\ \mu\text{m}$ Durchmesser sowie Leiterbahnen und Ag/AgCl-Mikroelektroden eingebettet sind (MECA 16, Ionera Technologies, Freiburg). Der Chip wurde über die Vorverstärker innerhalb eines Faraday-Gehäuses mit einem 16-Kanal-Verstärker und zugehörigem Steuer- und Aufzeichnungsprogramm (Triton, Tecella, Costa Mesa, CA, USA) verbunden. Die Messzelle wurde mit Messlösung gefüllt und etwa $0,1\ \mu\text{l}$ Lipidlösung ($5\ \text{mg ml}^{-1}$ DPhPC in Oktan) mit Hilfe eines Polytetrafluorethylen (PTFE)-Magnetührstabes über den Mikrokavitäten ausgebreitet, so dass sich an deren Rändern ein *seal* bildete. Nach einem Stabilitätstest und Zugabe von Protein konnten bis zu 16 Membranen parallel beobachtet werden. Wurde eine Insertion vermutet, wurde auf einen rauschärmeren Axopatch-Einkanalverstärker umgeschaltet. Die Ströme bei Haltepotenzialen von $-80\ \text{mV}$ bis $+80\ \text{mV}$ wurden mit einer Abtastrate von $200\ \text{kHz}$ aufgezeichnet und zur Darstellung mit $1\ \text{kHz}$ gefiltert. Die Messungen am Orbit 16-System wurden unter Anleitung von Dr.ⁱⁿ Ekaterina Zaitseva am Physiologischen Institut II der Universität Freiburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Behrends durchgeführt. Nach dem gleichen Bauprinzip, jedoch mit vier Kanälen, funktionierte das Orbit-mini-System (ebenfalls Nanion Technologies, München) mit eOne-Verstärker und EDR-Steuerprogramm (elements SRL, Cesena, IT). Das DPhPC in Oktan wurde hier mit Hilfe eines feinen Pinsels

über den Kavitäten verteilt. Die Ströme bei Haltepotenzialen von -80 mV bis $+40\text{ mV}$ wurden mit einer Abtastrate von 20 kHz bis 50 kHz aufgezeichnet und zur Darstellung mit 1 kHz gefiltert.

2.5.4 Messungen an vertikalen künstlichen Membranen

Der Versuchsaufbau für die Einzelkanalmessungen in künstlichen Lipiddoppelschichten bestand aus einem modifizierten horizontalen Patch-Clamp-System (Port-a-Patch, Nanion Technologies, München), bei dem im externen Gerätemodus Silberdraht-Elektroden mit dem in einem abgeschirmten Gehäuse enthaltenen Vorverstärker und der abgeschirmten Erdung (engl. *driven shield*) verbunden werden konnten. Diese Port-a-Patch-Einheit, die Messkammer, ein Stereomikroskop und eine LED-Lampe wurden innerhalb eines Faraday-Käfigs montiert, sternförmig geerdet und mit der Messerde des Verstärkers (EPC-10, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz) verbunden. Zur Verringerung von Vibrationen stand der Messaufbau auf einem Isolationstisch aus Styroporblöcken und einer Steinplatte. Alle Verstärkereinstellungen, Messprotokolle und Filtereinstellungen wurden über einen Rechner mit dem Programm Patchmaster (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz) kontrolliert.

Die *Bilayer*-Messkammer (siehe auch Abschnitt 3.6.3, Abb. 30, Seite 75) bestand aus einem hausgefertigten, teilbaren PVC-Block aus zwei Halbkammern mit Sichtfenstern, welche durch ein Teflon-Septum in *cis*- und *trans*-Seite getrennt waren. Das Septum enthielt eine Apertur, über der zu Anfang der Experimente eine Lipiddoppelschicht aufgespannt wurde. Ag/AgCl-Elektroden ($380\text{ }\mu\text{m}$, 4N , Science Products GmbH, Hofheim) wurden in zwei separate, mit 3 M KCl gefüllte Elektrodenkammern eingetaucht und über Agarbrücken elektrisch mit den Halbkammern kontaktiert. Zur Herstellung der Ag/AgCl-Elektroden wurde die Oberfläche von Silberdraht ($99,9\%$) in einer hausgefertigten Apparatur elektrochemisch chloridiert. Agarbrücken wurden mit Hilfe eines Bunsenbrenners aus Glaskapillaren gebogen und mit 1% Agarose in 3 M KCl gefüllt.

Aperturherstellung Die Aperturen wurden von Hand gefertigt, indem ausgedünnte virginale PTFE-Folie ($50\text{ }\mu\text{m}$, Hightech-Flon Thomas Fahrner & Goran Vljajic GbR, Konstanz) mit Hilfe einer Minutie durchstochen und der entstandene Konus unter mikroskopischer Kontrolle mit einer Rasierklinge gekappt wurde. Die Minutien wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Michael Kuhlmann, Zoologisches Museum der CAU, zur Verfügung gestellt. Die Ränder von gleichmäßig runden und abgeflachten Schnitten mit einem Durchmesser von $100\text{ }\mu\text{m}$ bis $120\text{ }\mu\text{m}$ wurden anschließend durch 5 bis 10 Zündfunken aus einer hausgefertigten Anlage aus Zündspule (12 V , NGK, Ratingen), Kondensator ($0,33\text{ }\mu\text{F}$, 250 V , WIMA, Mannheim) und Laborspannungsquelle mit einer Spannung von 38 V poliert, bis sie absolut glattrandig waren (Abb. 7A).

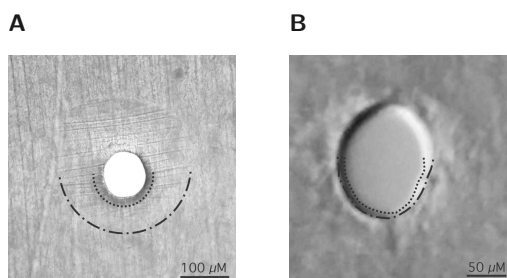


Abbildung 7: Aufbau von Apertur und vertikaler künstlicher Membran. **A** Apertur für vertikale *Bilayer*-Experimente mit äußerem Rand des Konusschnitts (Strichpunktlinie) und innerem poliertem Rand (punktirierte Linie); zur besseren Sichtbarkeit nur in einer Bildhälfte markiert. **B** In der Apertur aufgespannte Doppelmembran mit äußerem Annulus (Strichpunktlinie) und Begrenzung der eigentlichen Lipiddoppelschicht (punktirierte Linie).

Bilayer-Messungen Ein sauberes Septum mit Apertur wurde vor jeder Messung mit Vakuumsfett (Baysilone mittelviskos, Bayer AG, Leverkusen) zwischen den Kammerhälften eingedichtet, jede Halbkammer mit 575 μl Messlösung (200 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7,0 mit KOH) gefüllt und Elektroden sowie Agarbrücken installiert. Die Zugangswiderstände lagen in Standard-Messpuffer (200 mM KCl) bei 7 k Ω bis 15 k Ω . Nach Kompensation eventueller Potenzialunterschiede zwischen den Elektroden wurde mit Hilfe einer Luftblase am Ende einer Mikropipettenspitze eine kleine Menge 10 mM DPhPC in *n*-Oktan auf die Apertur aufgebracht. Die Bildung der Doppelmembranen wurde anhand der Zunahme des kapazitiven Stroms (siehe nächster Abschnitt) und mit Hilfe des Stereomikroskops im transmittierten Licht verfolgt. Nach Ausdünnen zu einer stabilen Lipiddoppelschicht lagen die durch Leckstrom verursachten Leitwerte unter 10 pS. Die Elektrodenstabilität wurde durch die Potenzialabweichung vor Herstellung und nach Ruptur des *Bilayers* beurteilt.

Beurteilung der Membranqualität Die Stromantwort auf einen triangulären Testpuls ist bei einer Verstärkung von 1 mV pA⁻¹ und einer zeitlichen Änderung der Spannung von $\frac{dV_m}{dt} = \pm 1 \text{ V s}^{-1}$ direkt proportional zur Kapazität.

$$I_C = C_m \cdot \frac{dV_m}{dt}$$

Während der Ausdünnung der unstrukturierten Lipid-Oktan-Schicht sank der beobachtete Strom um etwa die Hälfte und blieb nach Bildung der zentralen Lipiddoppelschicht und Stabilisierung der Plateau-Gibbs-Grenze zum Torus aus Reservelipid/Oktan konstant. Die Aperturen in der Größenordnung von 100 μm bis 120 μm ergaben je nach Größe der ausgebildeten Doppelschicht *Bilayer* mit Kapazitäten von 220 pF bis 350 pF. Die Kapazität hängt von der Permittivität des Lipids $\epsilon_0 \cdot \epsilon_m$ und der Fläche A und

Dicke δ der inneren Membran ab:

$$C = \frac{E}{Q} = A \cdot \frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_m}{\delta}$$

Aus der Gesamtkapazität C lässt sich die spezifische Kapazität $\frac{C}{A}$ als Maß für die Membrangüte sowie die Membrandicke δ berechnen, wenn die Fläche der Lipiddoppelschicht bekannt ist. Dazu wurden Fotografien der Membranen mit Fiji/ImageJ ausgewertet und die Fläche innerhalb der Torusgrenze ausgemessen (Abb. 7B). Die Berechnungen ergaben eine spezifische Kapazität von $0,84 \text{ pF cm}^{-2} \pm 0,09 \text{ pF cm}^{-2}$ und eine Dicke des hydrophoben Kerns von $2,47 \text{ nm} \pm 0,25 \text{ nm}$ (unter Annahme einer Dielektrizitätskonstanten von $2,1 \text{ F m}^{-1}$ für das Lipid; $n=11$). Dies liegt im Bereich der Literaturwerte für Membranen aus Asolectin ($C_m = 0,7 \text{ } \mu\text{F cm}^{-2}$ bis $0,86 \text{ } \mu\text{F cm}^{-2}$, $\delta = 2,8 \text{ nm}$ bis $2,3 \text{ nm}$ (siehe z.B. Niles et al. (1988)). Die vorgestellten prinzipiellen Berechnungen dienten der Beurteilung, ob eine echte Lipiddoppelschicht vorlag und der Messaufbau korrekt funktionierte. Es handelt sich um Abschätzungen, da ohne Kalibrierung des Verstärkers gearbeitet wurde und z.B. Hintergrundkapazität, Ionenstärke der Lösungen oder Flächenkontraktion durch die angelegte Spannung nicht berücksichtigt wurden.

Die Einzelkanalströme wurden mit einem 10 kHz- und 2 kHz Bessel-Filter in Reihe gefiltert (effektive Bandbreite $f_c = 1,96 \text{ kHz}$) und mit einer Abtastrate von 20 kHz aufgezeichnet. Die Messdaten wurden anschließend mit einem 8-Pol Tiefpass-Bessel-Filter mit einer -3 dB -Frequenz von 1 kHz gefiltert. Der Strom des geschlossenen Zustands wurde gleich Null gesetzt, Rohdatenhistogramme aus allen Datenpunkten erstellt und die Spitzenwerte durch eine Kurvennäherung aus der Summe zweier Gauss-Funktionen ohne Beschränkungen erhalten. Anschließend wurde die Einzelkanaldetektion mit den Spitzenwerten als Startpunkt nach der 50 %-Schwellenmethode ausgeführt. Nur Ereignisse länger als 0,3 ms wurden berücksichtigt. Aus den Ereignislisten wurden die Offen- und Geschlossen-Zustände extrahiert, daraus Amplitudenhistogramme erstellt und die Spitzenwerte durch eine Gauss-Kurvennäherung mit der Einschränkung $y = 0$ für die Einzelzustände erhalten. Aus diesen Maxima wurde die Strom-Spannungs-Beziehung dargestellt. Die Flächen dienten zur Berechnung von p_o unter den Annahmen, dass die Messung im stationären Zustand erfolgte und nur ein Kanal in der Membran enthalten war, der einem einfachen Zwei-Zustands-Modell folgte (Colquhoun und Sigworth, 1995). Die Leitwerte wurden unter der Annahme, dass das Umkehrpotenzial E_{rev} in symmetrischen Messbedingungen Null ist, aus dem Einzelkanalstrom i bei einem bestimmten Membranpotenzial V_m berechnet.

$$g = \frac{i}{(V_m - E_{rev})}$$

2.6 Datenbanken und Programme

Die Verwandtschaftsbeziehungen der K2P-Kanäle wurden mit Clustal Ω (Chojnacki et al., 2017) berechnet und das Phänogramm in Jalview2 (Waterhouse et al., 2009) dargestellt.

Für Klonierungsplanung und Kartenerstellung wurden Serial Cloner (Version 2.6.1, Franck Perez, SerialBasics, FR) und SnapGene Viewer (GSL Biotech LLC, Chicago, IL, USA) verwendet.

Die TEVC-Messungen an *Xenopus-laevis*-Oocyten wurden mit Patchmaster (Version v2x90, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz) gesteuert und aufgezeichnet. Die Auswertung der TEVC-Messungen erfolgte mit Fitmaster (Version v2x90, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz).

Die Einzelkanalmessungen am Orbit16-System wurden mit TecellaLab (Tecella LLC, Foothill Ranch, CA, USA) gesteuert und aufgezeichnet und in GePulse (Michael Pusch, Istituto di Biofisica Genova, Milano, IT) bearbeitet. Einzelkanalmessungen am Orbitmini-System wurden mit EDR (Version 2 und 3, elements SRL, Cesena, IT) gesteuert und aufgezeichnet. Die Einzelkanalmessungen am Port-a-Patch, in unilamellaren Blasen und in den vertikalen Membranen wurden mit Patchmaster (Version v2x90, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz) gesteuert und aufgezeichnet. Für alle Einzelkanalmessungen erfolgte die Grundlinienkorrektur und Einzelkanaldetektion sowie die Verarbeitung der Ereignislisten in Clampfit (Version 10.6.1.1., Molecular Devices LLC, San José, CA, USA).

Histogramme, Graphen und Kurvennäherungen wurden in Igor Pro (Version 6.37, WaveMetrics Inc., Lake Oswego, OR, USA) erzeugt und dargestellt. Bildauswertung und -bearbeitung wurden in Fiji/ImageJ (Version 2.0.0-rc-69/1.52i, <https://www.imagej.net>), Inkscape (Version 0.92, <https://inkscape.org>) und GIMP (Version 2.10, <https://www.gimp.org>) ausgeführt.

Die Visualisierungen der Kristallstrukturen wurden mit PyMOL (Version 1.8.6.0, Schrodinger LLC (2015)) unter Verwendung der angegebenen PDB-Dateien erzeugt.

Zur Konvertierung und Geometrieoptimierung chemischer Strukturen dienten die Open Babel-Bibliothek (O'Boyle et al., 2011) und Avogadro (Version 1.2.0, Hanwell et al. (2012)).

In dieser Arbeit wurden Farbtabelle für Nutzer mit Farbsehschwäche eingesetzt (Wong, 2011).

Für Struktur- und Sequenzinformationen wurden folgende Datenbanken und Server genutzt:

Protein Data Bank (Berman et al., 2000), <https://www.rcsb.org>

NCBI Blast (Altschul et al., 1990), <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Genbank (Benson et al., 2017), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

ExpASy Programme (Gasteiger et al., 2003) <https://www.expasy.org/>

UniProt (The UniProt Consortium, 2018), <https://www.uniprot.org/>.

3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die zellfreie Synthese funktioneller K2P-Kanäle und deren elektrophysiologische Charakterisierung. Zunächst werde ich die Etablierung eines geeigneten zellfreien Systems beschreiben, welches diverse K2P-Kanäle herzustellen vermag. Die zellfreie Herstellung und Weiterverarbeitung der Kanalproteine soll dabei keine Trunkierungen oder Mutationen erfordern, um die biochemische Stabilität und Funktion zu erhalten. Ich werde anhand von TREK1- und TREK2-Kanälen darstellen, dass eine Synthese in voller Länge möglich ist und zur Optimierung der Synthese GFP-Fusionsproteine einsetzen, für die ich zeige, dass sie sich wie die Wildtypkanäle verhalten. Dabei kann ich demonstrieren, dass TREK-Kanäle während der Reaktion in verschiedenen Lipidumgebungen wie SUV und GUV insertieren. Schließlich werde ich nachweisen, dass diese zellfrei synthetisierten TREK-Kanäle und auch ihre GFP-Fusionsproteine funktionell sind und in einer vertikalen künstlichen Membran elektrophysiologisch untersucht werden können.

3.1 Herstellung der K2P-Konstrukte und Testung der GFP-Fusionsproteine

Die verschiedenen Expressionssysteme, die GFP-Faltungskontrolle und die Versuche mit GUV erforderten die Subklonierung der kodierenden K2P-Sequenzen mit den benötigten Proteinmarkierungen (engl. *Tags*) und Proteaseschnittstellen in geeignete Vektoren (Abschnitt 2.1.2, Seite 22). Die in diese Arbeit eingegangenen kodierenden K2P-Kanalsequenzen sind in Tabelle 12 mit ihren Genbank-Zugangsnummern und Eckdaten der resultierenden Kanalproteine aufgelistet. Die Spezies wird im folgenden mit kursiven Kleinbuchstaben vor dem Kanalnamen gekennzeichnet (*h*, human; *r*, Ratte; *m*, Maus und *cp*, Meerschweinchen).

Der Aufbau der verwendeten Konstrukte ist in Abb. 8 dargestellt. Es wurde vorausgesetzt, dass die His- und HA-Markierungssequenzen keinen Einfluss auf die prinzipielle Expression und Funktion der Kanäle haben und in den Experimenten wurde nicht zwischen unmarkierten und markierten Kanälen unterschieden.

Für den Einsatz im gekoppelten *E. coli*-basierten zellfreien System wurden die Fragmente von *h*TRAAK, *r*TREK1 und *cp*TASK3 als Vertreter der gut charakterisierten K2P-Unterfamilien TREK und TASK in den pIVEX23w-GFPc-Vektor für prokaryotische Expression unter dem T7-Promoter subkloniert. Synthetisierte Proteine stellten GFP-Fusionen mit N-terminaler HA- und C-terminaler 10xHis-Proteinmarkierungssequenz dar (Abb. 8A). Für die zellfreie Synthese im Weizenkeimextrakt mit vorhergehender *in-vitro*-Transkription wurden alle K2P-Kanalsequenzen in das pEU-Plasmid

Tabelle 12: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten kodierenden Sequenzen und ihrer Proteinprodukte

Name	Spezies	Genbank-Eintrag	UniProt-Eintrag	Länge (AS)	M kDa*
<i>r</i> TREK1	<i>Rattus norvegicus</i>	NM_172042	Q920B6	426	46,782
<i>cp</i> TASK3	<i>Cavia porcellus</i>	NM_001172977	Q9JL58	365	40,638
<i>h</i> TRAAK	<i>Homo sapiens</i>	AF247042	Q9NYG8-2	419	45,173
<i>h</i> TREK2	<i>Homo sapiens</i>	NM_138318	P57789-4	543	60,111
<i>h</i> TREK1	<i>Homo sapiens</i>	NM_001017425	O95069	426	46,962
<i>h</i> TALK2	<i>Homo sapiens</i>	EU978944	Q96T54	332	36,895

AS, Aminosäuren; * Molekulargewicht (M) berechnet mit ExPASy ProtParam (Artimo et al., 2012).

mit SP6-Promoter und TMV Ω -Sequenz als Verstärker eingesetzt. Sie kodierten auch einen N-terminalen 6xHis- und einen C-terminalen HA-*Tag* zur späteren Detektion im *Western Blot* (Abb. 8B). Das in Abb. 8C gezeigte Konstrukt mit TEV-Schnittstelle zwischen Kanal und GFP-Fusionsprotein wurde für *r*TREK1- und *h*TREK2-Kanäle hergestellt und diente der Optimierung und den GUV-Experimenten im Weizenkeim- und Tabakzellextrakt. Die Primärsequenz des humanen und des Ratten-TREK1-Kanals ist zu 95,5 % identisch und weist bei einer gleichen Gesamtlänge von 426 Aminosäuren 19 abweichende Positionen auf (davon fünf im Aminoterminal und sechs im Carboxyterminal), von denen 14 konservativ ausgetauscht sind. Es wurde daher angenommen, dass sich dieser Kanal wie sein humanes Homologes verhält. Zur Verwendung in der Mikroskopie wurden solche GFP-Konstrukte außerdem in den pFAW-Vektor mit CMV-Promoter für die Expression in HEK 293-Zellen eingefügt. Das Konstrukt mit His- und HA-*Tags* entsprach dem Aufbau in Abb. 8B.

Der Zweck der carboxyterminalen GFP-Fusion war im ersten Schritt ein vereinfachtes Auswahlverfahren funktionierender Synthese- und Reinigungsbedingungen. Die Fluoreszenzintensität sollte schnell einen Anhalt für die Syntheseausbeute geben und in der weiteren Optimierung die Identifikation der K2P-Banden im Gel und die Verfolgung der Reinigungsschritte erleichtern. Um nur solche Bedingungen weiterzuverfolgen, unter denen möglichst viel korrekt gefaltetes Kanalprotein entsteht bzw. erhalten bleibt, wurde die GFP-Fusion im zweiten Schritt als Indikator für eine richtige Faltung verwendet. Der Einsatz von GFP-Fusionen als Faltungskontrolle wurde von Waldo et al. (1999) beschrieben und beruht auf der Beobachtung, dass sich eine Fehlfaltung des

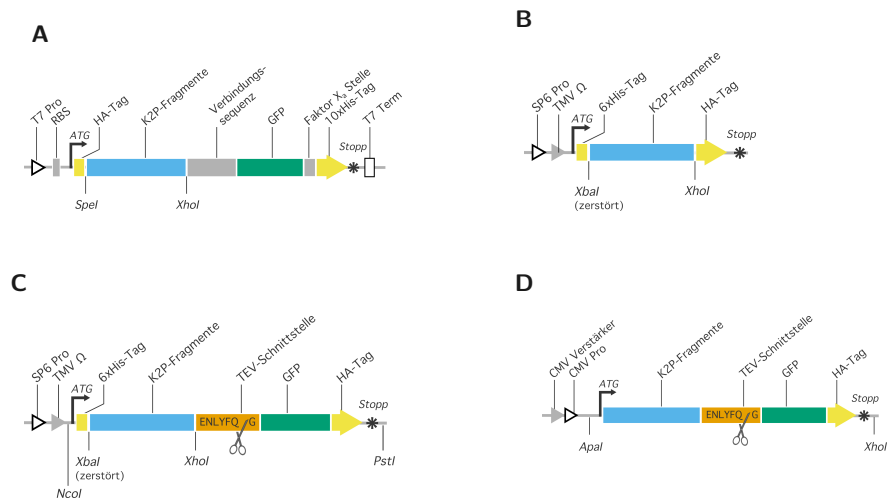


Abbildung 8: Aufbau der Konstrukte für die zellfreien Proteinsynthesen und die Expression in HEK 293-Zellen. **A** Expressionskassette für die gekoppelte Transkription/Translation im *E. coli*-Extrakt mit T7-Promoter, bakterieller Ribosomenbindungsstelle und T7-Terminator. Das translatierte K2P-GFP-Fusionsprotein trug einen N-terminalen HA- und einen C-terminalen 10xHis-Tag. Die Faktor X_a-Proteaseschnittstelle wurde in dieser Arbeit nicht verwendet. **B** Konstrukt mit SP6-Promoter und translationaler TMVΩ-Verstärkersequenz für die Synthese von K2P-Kanalprotein mit N-terminalem HA-Tag im Weizenkeim- und Tabakzellsystem. **C** Das wie **B** für das Weizenkeimextrakt geeignete Konstrukt enthielt zusätzlich zu den N-terminalen His- und C-terminalen HA-Tags eine GFP-Markierung. Zwischen der K2P-Proteinsequenz und dem GFP-Fusionspartner lag die Proteaseschnittstelle für TEV. **D** Konstrukt mit CMV-Promoter für die Expression eines GFP-markierten Kanals in Säugerzellen. Die TEV-Schnittstelle wurde nicht verwendet. Pro, Promoter; RBS, Ribosomenbindungsstelle; Term, Terminator. Der Pfeil mit ATG markiert den Translationsstart und der Stern das Stoppcodon. Die Schnittstellen der zur Herstellung verwendeten Restriktionsendonukleasen sind angegeben.

Zielproteins mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das fusionierte GFP überträgt und so die Reifung des Fluorophors verhindert. Zusätzlich kann die Fluoreszenz in Verbindung mit einem *Western Blot* als Maß für den Anteil korrekt gefalteten Proteins am insgesamt synthetisierten Protein dienen (Geertsma et al., 2008). Dieses Prinzip wurde z.B. in Müller-Lucks et al. (2012) erfolgreich zur Untersuchung zellfrei synthetisierter Aquaporine angewendet.

3.2 Die GFP-Fusion verändert nicht die Eigenschaften von hTREK2-GFP-Kanälen

Das Fusionsprotein sollte sich in seinen biochemischen Eigenschaften während der Herstellung und Reinigung und auch in den zell- und elektrophysiologischen Charakteristika

möglichst wenig vom Wildtypkanal unterscheiden. Daher wurde als erstes in etablierten Expressionssystemen untersucht, ob sich TREK1/2-GFP-Fusionsproteine wie Wildtypkanäle verhalten.

3.2.1 *r*TREK1-GFP-Kanäle sind sowohl in *Xenopus-laevis*-Oocyten als auch in HEK 293-Zellen an der Plasmamembran lokalisiert

Um zu zeigen, dass der GFP-Fusionskanal wie der Wildtyp in die Plasmamembran inseriert, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in *Xenopus-laevis*-Oocyten und HEK 293-Zellen angefertigt (siehe Abschnitt 2.4.2, Seite 36). *In vitro* transkribierte, kappentragende RNS für *r*TREK1-GFP wurde in *Xenopus-laevis*-Oocyten exprimiert und diese anschließend durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie untersucht.

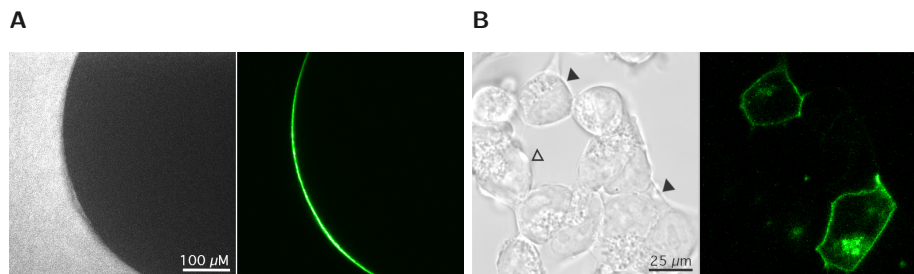


Abbildung 9: Membranfluoreszenz von *r*TREK1-GFP-Fusionsproteinen in *Xenopus-laevis*-Oocyten und HEK 293-Zellen. **A** Konfokalmikroskopische Aufnahme einer *Xenopus-laevis*-Oocyte nach Injektion von *r*TREK1-GFP-RNS; links Durchlicht-, rechts GFP-Fluoreszenzkanal. **B** Aufnahme von HEK 293-Zellen nach Transfektion mit *r*TREK1-GFP-DNS; links Durchlicht-, rechts GFP-Fluoreszenzkanal. In der Durchlichtaufnahme markieren schwarze Pfeile die fluoreszierenden Zellen und der offene Pfeil eine nicht transfizierte Zelle ohne Fluoreszenzsignal.

Die *r*TREK1-GFP-Fluoreszenz befand sich in der Oocytenmembran (Abb. 9A). Auch nach Transfektion von HEK 293-Zellen mit der entsprechenden DNS konnte die TREK1GFP-Fluoreszenz in der Plasmamembran beobachtet werden (Abb. 9B). In nicht RNS-injizierten Oocyten und in nicht transfizierten HEK 293-Zellen (siehe umgebende Zellen in Abb. 9B) wurde hingegen keine GFP-Fluoreszenz detektiert. Einschränkend ist zu sagen, dass die mikroskopische Auflösung nicht ausreicht, um eine Insertion in die Plasmamembran beispielsweise von einer Membranassoziation zu unterscheiden. Die GFP-Fusionskanäle wurden daher in *Xenopus-laevis*-Oocyten elektrophysiologisch charakterisiert.

3.2.2 *h*TREK2-GFP bildet einen funktionellen Kaliumkanal

Zur elektrophysiologischen Darstellung der Kaliumströme wurden Wildtypkanäle und GFP-Fusionsproteine in *Xenopus-laevis*-Oocyten exprimiert und mit Hilfe der TEVC-Messtechnik charakterisiert (Abschnitt 2.5.1, Seite 38). Mit 2 mM K⁺ in der Badlösung konnten in beiden Fällen auswärts gleichrichtende Kanäle dargestellt werden, deren Ströme nicht unterscheidbar waren. In Abb. 10A und Abb. 10B sind Beispiele der Stromantworten von *h*TREK2- bzw. *h*TREK2-GFP-Kanälen auf ein 300 ms-Stufenprotokoll von -100 mV bis +60 mV dargestellt. Aus den letzten 200 ms der stationären Stromantworten von Wildtyp und GFP-Fusionsprotein wurden die in Abb. 10C gemeinsam gezeigten Strom-Spannungs-Beziehungen erstellt. Die Strom-Spannungs-Beziehungen von Wildtypkanal und GFP-Fusionskanäle waren nicht unterscheidbar (Abb. 10). Die Fusionskanäle insertierten somit wie der Wildtypkanal in die Plasmamembran.

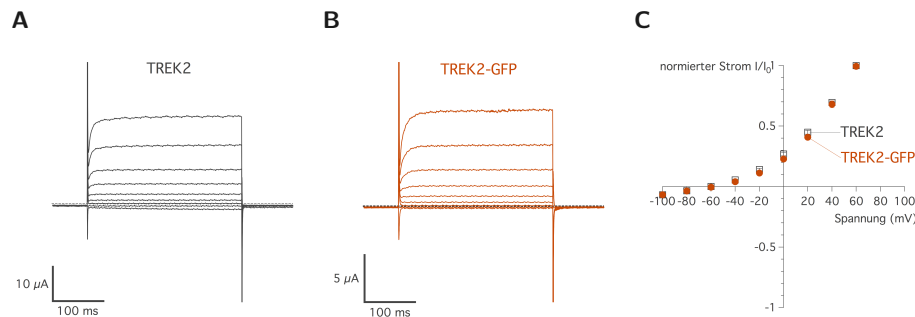


Abbildung 10: *h*TREK2- und *h*TREK2-GFP-Ströme gemessen an *Xenopus-laevis*-Oocyten. Repräsentative Stromantworten von *h*TREK2- (A) und *h*TREK2-GFP-Kanälen (B) auf ein Stufenprotokoll von -100 mV bis +60 mV in 20 mV-Inkrementen mit 300 ms Dauer in ND 96. C Strom-Spannungs-Diagramm von *h*TREK2- (schwarze offene Quadrate) und *h*TREK2-GFP-Kanälen (orange gefüllte Kreise) erstellt aus Messungen wie in A und B. Dargestellt ist der auf den maximalen Strom bei +60 mV normierte Strom ± Standardfehler mit n=11 für beide Konstrukte.

3.2.3 *h*TREK2- und *h*TREK2-GFP-Kanäle sind durch extrazellulären pH, Rutheniumrot und 2-APB modulierbar

TREK2 und TREK2-GFP sind durch extrazelluläre Ansäuerung aktivierbar. Auch Regulierungsmechanismen, also Aktivierung und Inhibition, sollten an den GFP-Fusionsprotein wirken wie am Wildtypkanal. Sandoz et al. (2009) haben bereits die Aktivierung von TREK2-Kanälen durch Senkung des extrazellulären pH-Werts beschrieben. Beispiele solcher Stromantworten beim Wechsel der Badlösung von pH 7,4 zu pH 6 sind

in Abb. 11A für TREK2- und in Abb. 11B für TREK2-GFP-Kanäle dargestellt. Nach Auswertung der Ströme bei +10 mV lag die Aktivierung durch pH 6 für den *h*TREK2-Kanal bei $37,7\% \pm 6,9\%$ ($n=7$) und für den *h*TREK2-GFP-Kanal bei $39,8\% \pm 3,5\%$ ($n=8$). Die pH-Aktivierung von Fusionsprotein gegenüber dem Wildtypkanal war nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 11C), wie ein *t*-Test bestätigte.

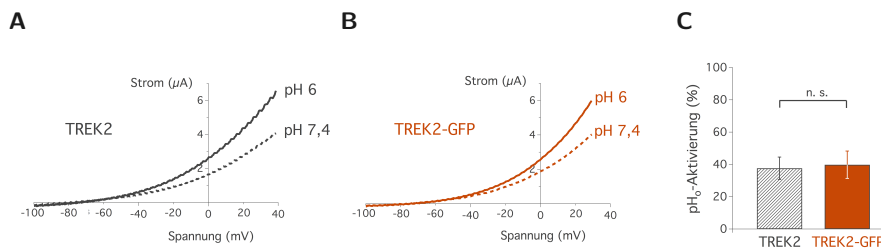


Abbildung 11: Extrazelluläre Ansäuerung aktiviert *h*TREK2- und *h*TREK2-GFP-Kanäle in *Xenopus-laevis*-Oocyten gleichermaßen. **A** Beispielmessung des *h*TREK2-Stroms in ND 96 mit einem Rampenprotokoll von -100 mV bis $+40$ mV bei pH 7,4 (punktierter Linie) und pH 6 (durchgezogene Linie). **B** Ebenso *h*TREK2-GFP-Grundstrom bei pH 7,4 (punktierter Linie) und pH 6-Aktivierung (durchgezogene Linie) unter den gleichen Messbedingungen. **C** Vergleich der prozentualen extrazellulären pH-Aktivierung (pH_o) von *h*TREK2 (schwarz schraffiert, $n=7$) und TREK2-GFP (orange gefüllt, $n=8$) bei $+10$ mV; n. s., nicht signifikant.

TREK2 und TREK2-GFP sind in ähnlichem Umfang mit Rutheniumrot blockierbar.

Rutheniumrot ist ein polykationischer Farbstoff, der K2P-Kanäle von extrazellulärer Seite blockiert. Der *h*TREK2-Kanal wird laut Braun et al. (2015) zu etwa 75 % blockiert und hat damit die höchste Affinität unter den bisher getesteten K2P-Kanälen. Die Stromantwort von *h*TREK2- und *h*TREK2-GFP-Kanälen vor und nach Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Rutheniumrot in 2 mM K^+ bei pH 7,4 wurde in Rampenprotokollen von -100 mV bis $+40$ mV gemessen (Abb. 12). Beide Konstrukte wurden ähnlich durch $10 \mu\text{M}$ Rutheniumrot blockiert, wie die Beispielmessungen in Abb. 12A und Abb. 12B veranschaulichen. Die Auswertung der Ströme bei $+10$ mV ergab für *h*TREK2 eine Inhibition von $66,1\% \pm 3,7\%$, *h*TREK2-GFP wurde zu $48,1\% \pm 9,9\%$ blockiert. Das Balkendiagramm in C stellt das leicht unterschiedliche Ausmaß der Rutheniumrot-Inhibition dar; ein *t*-Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen *h*TREK2- und *h*TREK2-GFP-Kanälen ($n=4$ für beide Kanäle).

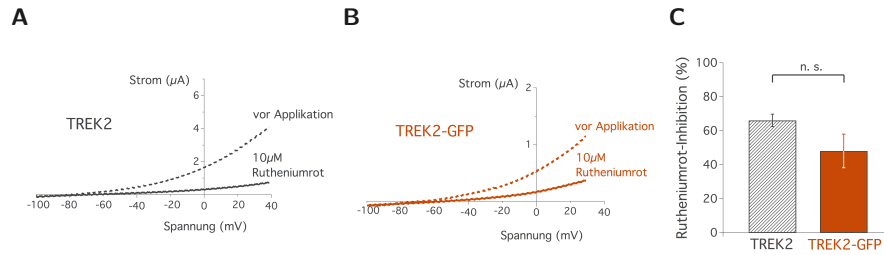


Abbildung 12: Rutheniumrot blockiert *hTREK2*- und *hTREK2-GFP*-Kanäle in Oocyten. **A** Beispiele für *hTREK2*- und **B** *hTREK2-GFP*-Stromantworten im Rampenprotokoll von -100 mV bis $+40$ mV in ND96 vor (punktierter Linie) und nach Applikation von $10 \mu\text{M}$ Rutheniumrot (durchgezogene Linie). **C** Vergleich der prozentualen Inhibition durch $10 \mu\text{M}$ Rutheniumrot für TREK2- und TREK2-GFP-Kanäle (beide $n=4$); n. s., nicht signifikant.

***hTREK2-GFP* lässt sich wie *hTREK2* über den Carboxyterminus aktivieren.** Die bisher getesteten Regulationsmechanismen wirken von extrazellulärer Seite auf das Selektivitätsfiltergate. Durch die GFP-Fusion wurde jedoch der Carboxyterminus modifiziert und es sollte daher durch den Aktivator 2-APB mit bekannter Bindungsregion im proximalen C-Terminus (Beltrán et al., 2013; Zhuo et al., 2015) überprüft werden, ob die Funktion des Carboxyterminus bzw. die Übertragung von Stimuli zum Selektivitätsfilter durch die Fusion verändert war.

hTREK2 und *hTREK2-GFP* wurden im Rampenprotokoll von -100 mV bis $+20$ mV durch Superfusion steigender 2-APB-Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$ bis 10 mM in der Badlösung (ND96 pH 7,4) aktiviert und die Stromantworten bei $+10$ mV analysiert (Abb. 13A und Abb. 13B). Bei einer Konzentration von 10 mM trat durchgängig ein inhibierender Effekt auf, so dass die Kurvenapproximationen zur Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven nur bis zur Konzentration von 3 mM 2-APB angepasst wurden. Die in Abb. 13C gezeigte Hill-Kurvennäherung ergab für *hTREK2*-Kanäle einen EC_{50} von $0,46 \text{ mM} \pm 0,03 \text{ mM}$. Für *hTREK2-GFP*-Kanäle wurde mit $0,43 \text{ mM} \pm 0,08 \text{ mM}$ ein sehr ähnlicher Wert erhalten ($n=10$ für beide Kanäle). Das GFP-Fusionsprotein unterscheidet sich damit nicht signifikant vom Wildtypkanal.

Die Visualisierung der Plasmamembranlokalisation und die elektrophysiologischen Experimente zeigten für die betrachteten Stimuli keine bedeutenden Abweichungen zwischen *hTREK2-GFP* und dem Wildtypkanal auf, so dass das GFP-Konstrukt für den geplanten Einsatzzweck geeignet erschien.

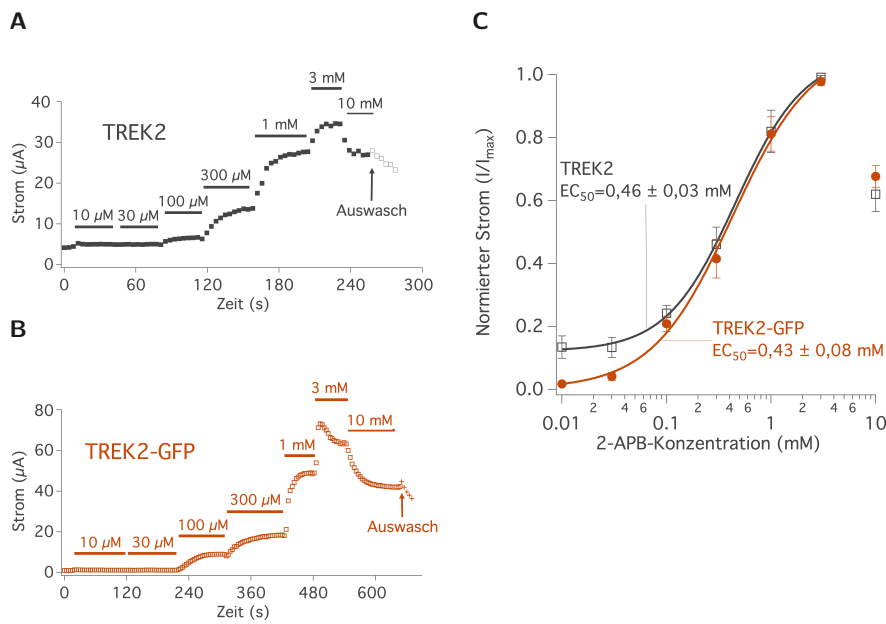


Abbildung 13: 2-APB-Aktivierung von *hTREK2*- und *hTREK2*-GFP-Kanälen in *Xenopus-laevis*-Oocyten. **A** Beispiel für eine konzentrationsabhängige 2-APB-Aktivierung von *hTREK2*-Kanälen mit 0,01 mM bis 10 mM 2-APB gemessen im Rampenprotokoll mit Auswertung der Ströme bei +10 mV. Beispiele für Stromspuren bei den mit a, b, und c markierten Konzentrationen sind rechts gezeigt. **B** Entsprechende Wirkung von 2-APB auf *hTREK2*-GFP-Kanäle, gezeigt anhand einer Beispielmessung unter den gleichen Bedingungen. **C** Aus A und B abgeleitete Dosis-Wirkungs-Kurven von *hTREK2*- (schwarze offene Quadrate) und *hTREK2*-GFP-Kanalproteine (orange gefüllte Kreise), $n=10$ für beide Kanäle.

3.3 Zellfreie Expression von K2P-Kanälen in verschiedenen Systemen

Als nächstes sollte ein geeignetes zellfreies Expressionsverfahren für K2P-Kanäle identifiziert werden. Dazu wurden drei Systeme getestet: Das prokaryotische *E. coli*-Extrakt, das noch wenig angewendete BY2-Tabakzelllysat und das Weizenkeimextrakt.

3.3.1 Das bakterielle zellfreie System eignet sich nicht zur Produktion von K2P-Kanälen.

Die zellfreie Synthese im *E. coli*-Extrakt wurde mit *hTRAAK*-GFP-, *rTREK1*-GFP- und *cpTASK3*-GFP-Konstrukten (Abb. 8A) mit gekoppelter Transkriptions- und Translationsreaktion nach der Dialysemethode durchgeführt. Da eine Synthese funktioneller Membranproteine in *E. coli*-Extrakten meist die Bereitstellung einer hydrophoben Umgebung z. B. in Form von Mizellen erfordert (Sachse et al., 2014; Henrich et al., 2015), wurden die Reaktionen nach dem in der Arbeitsgruppe von Prof. Beitz (Pharmazeuti-

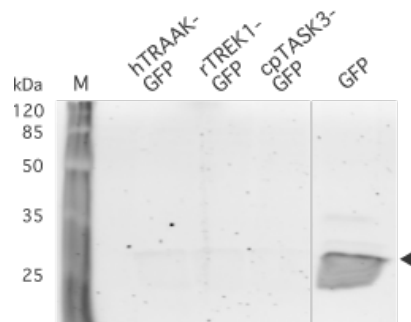


Abbildung 14: Nach zellfreier Reaktion im *E. coli*-Extrakt ist keine Synthese fluoreszierender K2P-Proteine nachweisbar. Beispielaufnahme der SDS-PAGE-Gelfluoreszenz nach zellfreier Reaktion mit *hTRAAK*-GFP-, *rTREK1*-GFP- und *cpTASK3*-GFP-Plasmiden. Die Fluoreszenzbande von löslichem GFP als Positivkontrolle war beim erwarteten Molekulargewicht von ~27 kDa detektierbar (schwarzer Pfeil). Bromphenolblau im vorgefärbten Molekulargewichtsstandard (M) fluoresziert ebenfalls.

ches Institut der CAU Kiel) etablierten Standardverfahren mit der Testung verschiedener Detergenzien kombiniert. Es wurden Brij 35, Brij 58, Brij 78, Brij 98 und Digitonin zugesetzt, die als nicht toxisch für das System und förderlich für lösliche Membranproteine im bakteriellen zellfreien System beschrieben wurden (Klammt et al., 2005; Müller-Lucks et al., 2012). Die Reaktionsansätze wurden nach der Inkubation von Präzipitat getrennt, einer Affinitätsreinigung über den *His-Tag* unterzogen und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Für keines der getesteten K2P-Konstrukte wurde allerdings eine Proteinsynthese im *E. coli*-Extrakt festgestellt (Abb. 14). Es ließ sich weder die GFP-Fluoreszenz der Fusionsproteine im SDS-PAGE-Gel beobachten noch konnte Protein durch *Western Blot* und Immunodetektion mit *anti-His*-Antikörper (HIS H8 1:1500) nachgewiesen werden.

3.3.2 Die Herstellung von K2P-Kanälen ist im Tabakzellextrakt möglich.

Da die Herstellung der Säugerkanäle möglicherweise ein eukaryotisches Expressionssystem erfordert, wurde die Synthese im Tabakzellextrakt untersucht. Dieses System wurde erst kürzlich etabliert und von Buntru et al. (2014) zunächst im ungekoppelten Modus durchgeführt (d. h. Zugabe von kappentragender RNS aus *in-vitro*-Transkription). In Buntru et al. (2015) folgte die Beschreibung des gekoppelten Modus (DNS-Zugabe mit Transkription und Translation im Extrakt). Beide Varianten wurden am Beispiel von *hTREK2*-GFP geprüft. Um zusätzlich festzustellen, ob eine m⁷G-Kappe der RNS Voraussetzung für die Synthese im Tabakzellextrakt ist oder RNS ohne Kappe ausreicht, wurden verschiedene RNS-Präparationen untersucht. Daneben reagiert die Translation

oft negativ auf die Anwesenheit von Ionen, die mit der RNS eingebracht werden, so dass sowohl durch Lithiumchloridfällung als auch durch Ammoniumacetatfällung gereinigte RNS verwendet wurde. In allen Reaktionen wurde dieselbe absolute Menge RNS bzw. DNS eingesetzt. Die Fluoreszenz der Reaktionsansätze wurde im Plattenlesegerät aufgenommen und die Proben anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die im Plattenlesegerät quantifizierte Gesamtfluoreszenzintensität der Reaktionsmischungen ist in Abb. 15A dargestellt und verdeutlicht die Unterschiede zwischen den RNS-Präparationen.

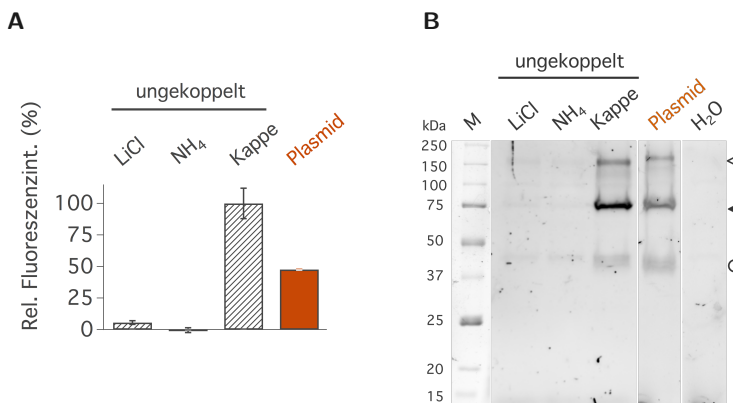


Abbildung 15: *hTREK2*-GFP-Protein wird im Tabakzellextrakt synthetisiert. A Auswertung der Gesamtfluoreszenz normiert auf die höchste Fluoreszenz mit kappentragender RNS. Ungekoppelte Reaktionen sind schwarz schraffiert, der gekoppelte Transkriptions-Translationsansatz orange gefüllt dargestellt. Alle Reaktionen wurden als Doppelbestimmungen ausgeführt und die Anzahl der Experimente war $n=2$ für kappentragende RNS und zirkuläres Plasmid und $n=3$ für alle übrigen. **B** Aufnahme der *hTREK2*-GFP-Fluoreszenzbanden im SDS-PAGE-Gel nach Reaktion mit verschiedener RNS/DNS. Das vermutliche *hTREK2*-GFP-Dimer ist mit einem offenen Pfeil, das Monomer mit einem gefüllten Pfeil und GFP mit einem offenen Kreis markiert.

Im in der AG Prof. Scheidig hausgefertigten Tabakzellextrakt fand eine Synthese von *hTREK2*-GFP-Protein statt. Die höchste Ausbeute wurde mit kappentragender RNS erreicht (entsprechend 100%). Danach folgte die gekoppelte Synthese mit zirkulärem Plasmid mit einer relativen Effizienz von $52\% \pm 4\%$ und schließlich die Reaktion mit Lithiumchlorid-gereinigter RNS ($5,5\% \pm 0,4\%$). Die Reaktion mit Ammoniumacetatgefällter RNS produzierte kein fluoreszierendes Protein. Nach sanfter Denaturierung und Auftrennung durch SDS-PAGE konnten im Gel drei Fluoreszenzbanden bei scheinbaren Molekulargewichten von ~ 180 kDa, ~ 75 kDa und ~ 40 kDa in den verschiedenen Ansätzen detektiert werden (Abb. 15B). Die Bandenintensitäten unterschieden sich zwischen den Ansätzen deutlich, wobei die beobachteten Intensitäten kongruent mit den in Abb. 15A gezeigten Ergebnissen zur Gesamtfluoreszenz waren. Die Fluoreszenzbanden

wurden als das *hTREK2*-GFP-Dimer, das *hTREK2*-GFP-Monomer sowie möglicherweise durch alternative Initiation oder Proteolyse entstandenes GFP interpretiert. Da das erwartete Molekulargewicht für das *hTREK2*-GFP-Monomer bei 90,3 kDa liegt, könnte die Beschaffenheit der ungereinigt aufgetragenen Reaktionsmischung für eine Abweichung verantwortlich sein. Eine Divergenz zwischen berechnetem und scheinbarem Molekulargewicht nach Elektrophorese ist zudem ein häufiges Phänomen bei der Untersuchung von Membranproteinen Rath et al. (2009). Dies wurde während meiner Arbeit vor allem beobachtet, wenn zur Erhaltung der GFP-Fluoreszenz die Denaturierung vor der SDS-PAGE schonend ausgeführt wurde und damit vermutlich nicht vollständig war.

3.3.3 Die zellfreie Synthese von K2P-Kanälen im Weizenkeimextrakt ist erfolgreich.

K2P-Kanäle lassen sich im Weizenkeimextrakt zellfrei synthetisieren. Die initialen Sichtungen im Weizenkeimextrakt wurden ohne GFP-Fusionen mit einer Reihe von K2P-Kanälen durchgeführt. Die zellfreie Synthese wurde im Schichtverfahren in 96-Loch-Platten ausgeführt (vgl. Abschnitt 2, Seite 35). Die Reaktionsmischungen wurden standardmäßig einer Affinitätsreinigung über den *His-Tag* in Anwesenheit von 0,5 % DDM zur Solubilisierung unterworfen, da bei Auftrag der gesamten Reaktionsmischung keine neu erscheinenden Banden unter den endogenen Proteinen identifizierbar gewesen waren. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die Banden wie in Abschnitt 2.2.2, Seite 28 beschrieben durch eine Silberfärbung detektiert.

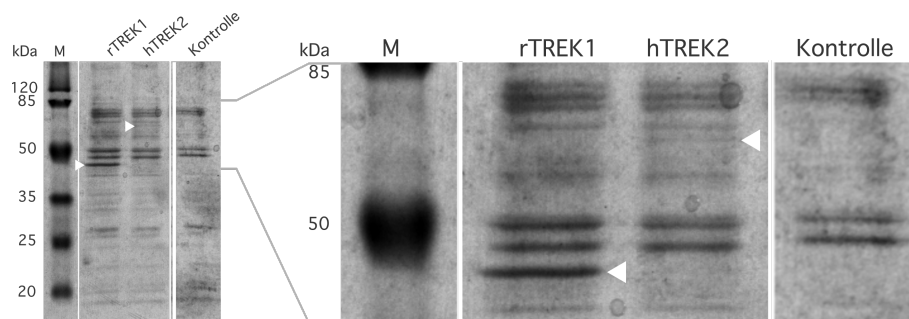


Abbildung 16: Im Weizenkeimextrakt lassen sich K2P-Kanäle zellfrei synthetisieren. Nach Affinitätsreinigung sind im Auftrag der Eluatfraktionen Banden entsprechend des erwarteten Molekulargewichts von *rTREK1* und *hTREK2* sichtbar (weiße Pfeile). Silberfärbung nach SDS-PAGE mit Vergrößerung (rechts); M, Molekulargewichtsstandard; Kontrolle mit H₂O statt RNS.

Das SDS-PAGE-Gel nach zellfreier Synthese von *rTREK1*- und *hTREK2*-Proteinen ist in Abb. 16 im Vergleich zur Negativkontrolle dargestellt und zeigt, dass zusätzliche

Banden bei einem Molekulargewicht von ~ 45 kDa bzw. ~ 60 kDa detektierbar waren. Die erwarteten Molekulargewichte für *rTREK1*- und *hTREK2*-Proteine liegen bei 47 kDa und 60 kDa (siehe Tabelle 12). Offensichtlich waren die unterschiedliche Expressionsniveaus oder aber die unterschiedlich effizienten Affinitätsreinigungen der beiden Kanäle. Ebenso war an zahlreichen weiteren Banden erkennbar, dass auch eine Reihe endogener Proteine in der Affinitätsreinigung durch Ni^{2+} -NTA-Agarose isoliert wurden.

***rTREK1*- und *hTREK2*-Kanäle werden in voller Länge synthetisiert.** Nachdem Banden passender Molekulargewichte nach der zellfreien Synthese von *rTREK1*-Kanälen sowie *hTREK2*-Kanälen identifiziert werden konnten, wurde durch Verwendung der His- und HA-Markierungssequenzen gezeigt, dass die Kanalproteine in voller Länge ohne Syntheseabbrüche entstehen. Die Reaktionsansätze wurden zuerst über den Aminoterminus mit His-Tag gereinigt und anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt (Abschnitt 2, Seite 27). Der *Western Blot* unter Verwendung des Antikörpers gegen den am Carboxyterminus vorhandenen HA-Tag wies die Entstehung der Kanäle in ihrer vollen Länge nach (Abschnitt 2, Seite 29). Die über Chemilumineszenz detektierten Banden für *rTREK1*- und *hTREK2*-Proteine sind in Abb. 17 dargestellt. Im *Western Blot* waren keine Banden niedrigerer Molekulargewichte detektierbar, die auf N-terminal gekürzte Varianten oder Proteolyseprodukte hinwiesen.

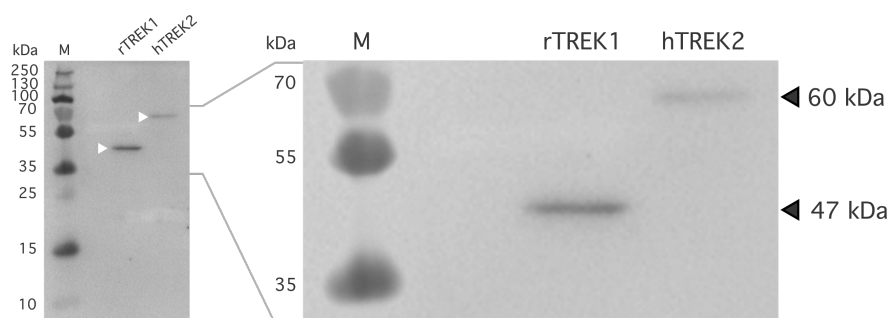


Abbildung 17: *rTREK1*- und *hTREK2*-Kanäle entstehen in voller Länge. Im *Western Blot* nach vorhergehender Reinigung über den aminoterminalen His-Tag wird der carboxyterminale HA-Tag von *rTREK1*- und *hTREK2*-Kanälen durch *anti*-HA Antikörper detektiert (1:10 000, Belichtungszeit 23 s; M, gefärbter Molekulargewichtsstandard aus Überlagerung mit Fotografie der Membran; rechts vergrößerte Darstellung).

Die bisherigen Experimente bewiesen, dass Kanalprotein der erwarteten Größe im Weizenkeimextrakt synthetisiert wurde, sagten aber nichts über die korrekte Faltung aus. Aus diesem Grund wurden nun die GFP-Fusionsproteine als Faltungsindikatoren eingesetzt (siehe Abschnitt 3.3.1, Seite 55).

Nach der Synthesereaktion der GFP-Fusionskanäle wurden die Reaktionsmischungen

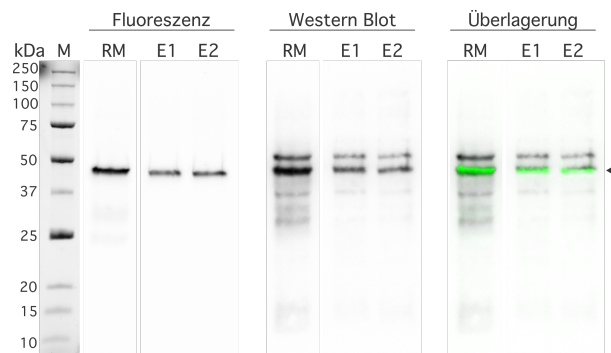


Abbildung 18: GFP-Fusionen machen den Anteil korrekt gefalteter *rTREK1*-GFP-Kanäle sichtbar. In der ungereinigten Reaktionsmischung (RM) und in den Eluatfraktionen (E1 und E2) nach Reinigung erschienen fluoreszierende Banden bei ~ 47 kDa (links). Im *Western Blot* mit *anti-TREK1*-Antikörper wurden Doppelbanden detektiert (1:1000, Belichtungszeit 5 s; Mitte), von denen die untere (Pfeil) der fluoreszierenden Bande entspricht (Überlagerung rechts, Fluoreszenzbande grün dargestellt). M, Molekulargewichtsstandard nach UV-Aktivierung.

wie oben geteilt und roh sowie nach Affinitätsreinigung durch SDS-PAGE aufgetrennt. Abb. 18 zeigt ein SDS-PAGE-Gel mit *rTREK1*-GFP. Nach Anregung des GFP im Gel war für jeden Auftrag eine einzige fluoreszierende Bande beim berechneten Molekulargewicht von 47 kDa vorhanden. Nach *Western Blot* desselben Gels und Immundetektion von TREK1 zeigten sich klare Doppelbanden bei ~ 47 kDa und ~ 50 kDa, von denen durch Überlagerung der Fluoreszenz- und Chemilumineszenzsignale die Bande niedrigeren Molekulargewichts als die fluoreszierende und damit korrekt gefaltete identifiziert wurde. Übereinstimmend sprach die höhere elektrophoretische Mobilität für die bei richtiger Faltung erwartete dichtere Packung, die schwieriger zu denaturieren ist. Das Verhältnis der Banden zueinander kann zur Abschätzung des Anteils an korrekt gefaltetem Protein verwendet werden (Geertsma et al., 2008; Müller-Lucks et al., 2012). Die Signalintensitäten im *Western Blot* (Abb. 18 Mitte) wurden ausgemessen und ergaben einen Anteil von 66,2%, 65,8% und 66,2% richtig gefalteter Kanäle für Reaktionsmischung und Eluatfraktionen. Damit synthetisierte das Weizenkeimextrakt K2P-Kanäle zum überwiegenden Teil in richtig gefalteter Form. Für verschiedene K2P-Kanäle wurden auch nach heterologer Expression Doppel- oder Dreifachbanden im *Western Blot* beschrieben, die als Glykosylierungsvarianten identifiziert wurden (Miller, 2013; Dong et al., 2015; Bobak et al., 2017). Dies konnte für das zellfrei hergestellte Protein aus zwei Gründen nicht der Fall sein, denn erstens führt das Weizenkeimextrakt keine Glykosylierungen aus, und täte es das, müssten vier Banden, je eine fluoreszierende und eine fehlgefaltete pro Glykosylierungsvariante entstanden sein. Auch hier wurden keine kürzeren Kanäle im *Western Blot* detektiert. Zusätzlich beweist auch die Fluoreszenz-

zentstehung des C-terminal fusionierten GFP selbst die Synthese von Vollängenprotein. Zu bemerken ist, dass im Unterschied zur Reaktionsmischung nach Reinigung keine zusätzliche GFP-Bande im Fluoreszenzgel detektiert wurde (vgl. auch Abb. 15B, Seite 57). Dieses Neben- oder Proteolyseprodukt trug demnach keinen His-*Tag* und wurde nicht mit isoliert.

Nach diesen Reaktionen mit dem TREK2-GFP-Konstrukt konnten die Syntheseausbeuten in den drei verwendeten Extrakte verglichen werden. Die Gegenüberstellung in Abb. 19 verdeutlicht, dass die leistungsfähigste Tabakzelleextrakt-Reaktion mit kappen-tragender RNS etwa 54 % der Fluoreszenzausbeute einer Vergleichsreaktion im Weizenkeimextrakt lieferte. Im gekoppelten System mit Plasmid betrug die relative Ausbeute etwa 25 %, während im E. coli-Extrakt keine Kanalsynthese beobachtet werden konnte. Dargestellt ist jeweils die Gesamtfluoreszenz einer Standardreaktion nach Literatur bzw. nach Herstelleranweisung (vgl. Abschnitt 2.3f., Seite 32). Das zellfreie Weizenkeimsystem war damit am vielversprechendsten und wurde zur weiteren Synthese der K2P-Kanäle eingesetzt.

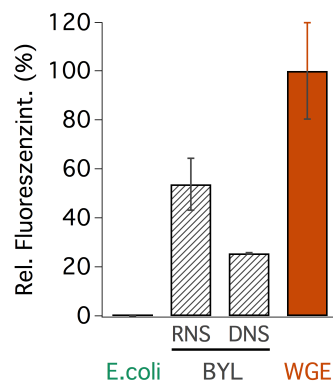


Abbildung 19: Vergleich der relativen Fluoreszenzausbeute in den drei untersuchten Extrakten. Gesamtfluoreszenz der Synthese von TREK-GFP-Proteinen im E. coli-Extrakt (Doppelbestimmung), im Tabakzelleextrakt (BYL, schwarz schraffiert) mit kappen-tragender RNS (RNS) und mit zirkulärem Plasmid (DNS) sowie im Weizenkeimextrakt (WGE) mit Ammoniumacetat-gefällter RNS (jeweils n=2 mit Doppelbestimmung).

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene K2P-Kanäle mit ihrer vollständigen Aminosäuresequenz im Weizenkeimextrakt synthetisiert werden und prinzipiell zu reinigen sind. Darüber hinaus deuteten GFP-Fusionen auf die korrekte Faltung der K2P-Kanäle hin. Jedoch sollte frühzeitig auf elektrophysiologischem Weg gezeigt werden, dass die Kanäle funktional sind. Eine Übersicht der verschiedenen dazu versuchten Strategien gibt Abb. 20.

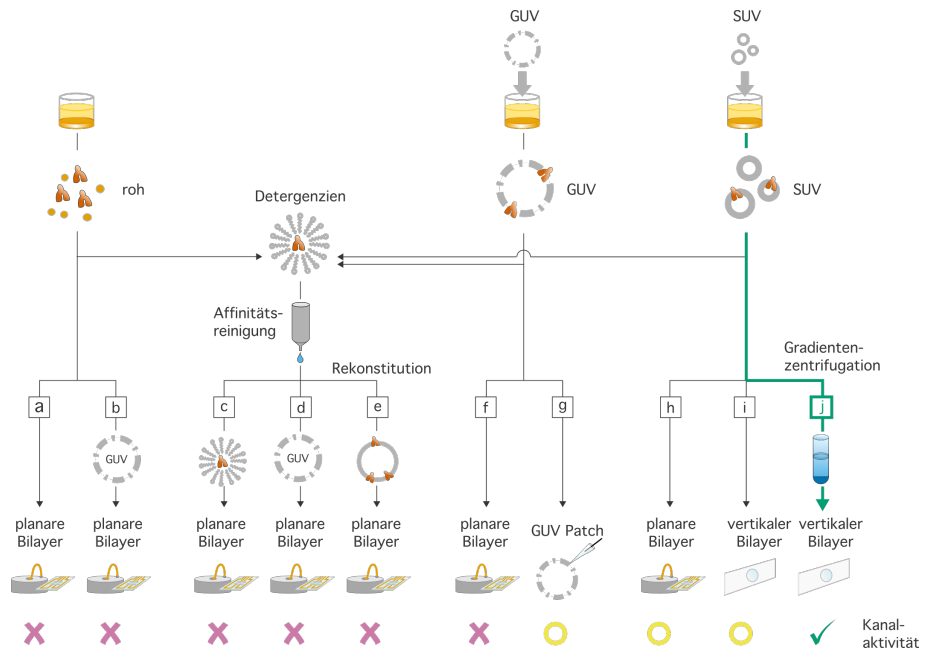


Abbildung 20: Übersicht über Versuche zur Produktion funktioneller K2P-Kanäle. Gezeigt sind Wege von der Synthese im Weizenkeimextrakt über Solubilisierungs- und Isolierungsversuche hin zum electrophysiologischen Experiment zur Funktionsbestätigung. Die Verwendung der Reaktionsmischung direkt oder in GUV führte nicht zum Nachweis funktioneller Kanäle (a, b). Die Reinigung der rohen oder lipidsupplementierten Reaktionsmischung unter DDM-Zusatz und anschließende GUV-Inkubation, direkte Zugabe in die Messkammer oder Rekonstitution in frisches Lipid führte ebenfalls nicht zu messbarer Kanalaktivität (c–e). Die Verwendung von Proteo-GUV aus der zellfreien Reaktion war auf planaren Membranen nicht erfolgreich (f), funktionelle Kanäle konnten hingegen durch *Patch-Clamp*-Messungen bestätigt werden (g). Der Einsatz von SUV in der zellfreien Synthese ermöglichte den Nachweis funktioneller Kanäle (h, i) und lieferte nach Reinigung der Proteoliposomen durch Dichtegradientenzentrifugation verwertbare Messungen (j). Der grüne, fette Pfeilverlauf zeigt die erfolgreiche Strategie.

Zunächst wurden Proben jeder Präparation als rohe Reaktionsmischung (Abb. 20 a) sowie in DDM-solubilisierter und affinitätsgereinigter Form (Abb. 20 c) mit und ohne vorhergehende Zentrifugation zur Trennung in Pellet und Überstand in planaren *Bilayer*-Systemen (Port-a-Patch und Orbit mini) getestet. Es war jedoch keine Aktivität nachweisbar und die Proben destabilisierten die künstlichen Membranen insbesondere im lösungsmittelfreien Port-a-Patch-*Bilayer* durch Extraktkomponenten und Detergensgehalt stark.

Die künstliche Membran im Port-a-Patch-System wird durch das Bersten eines GUV formiert (siehe auch Abschnitt 2.5.3, Seite 41), so dass die Möglichkeit besteht, dazu von vornherein proteinhaltige GUV zu verwenden. Durch Elektroformation hergestellte GUV wurden sowohl mit ungereinigter Reaktionsmischung als auch mit gereinigtem Kanalprotein inkubiert (Abb. 20 b). Auch eine Proteoliposomenformierung mit Entfernung des DDM durch Adsorption an Biobeads (Abb. 20 d) vor der Elektroformation von GUV wurde versucht. Dadurch kann es zu einem Übertritt des Kanalproteins in die GUV-Membranumgebung kommen. Schließlich wurde auch eine Inkorporation des gereinigten Proteins durch eine klassische Rekonstitution in Lipid-/Detergensmischungen durchgeführt (Abb. 20 e). Bei allen diesen Versuchen wurde jedoch keine Insertion mit Kanalaktivität beobachtet. Die beschriebenen Probleme könnten durch die niedrige Proteinausbeute und -konzentration in der Größenordnung von $80 \mu\text{g ml}^{-1}$ bis $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ Extrakt bedingt sein. Wünschenswert für direkte Insertionen wäre eine hohe Proteinkonzentration, um die Wahrscheinlichkeit des Auftreffens eines Kanalproteins auf die künstliche Membran zu erhöhen und gleichzeitig eine geringe Detergengkonzentration, um die Membran nicht zu destabilisieren. In Rekonstitutionen rekombinant hergestellter Proteine werden in der Regel Proteinstammlösungen mit Konzentrationen von 1 mg ml^{-1} oder mehr verwendet (vgl. Brohawn et al. (2012)), da die Rekonstitutionseffizienz ohne vorhergehende Optimierung vieler Faktoren niedrig sein kann (Rigaud et al., 1995). Auch zur Proteininsertion in elektroformierte GUV zur Verwendung auf dem Port-a-Patch werden vom Hersteller Konzentrationen von 1 mg ml^{-1} empfohlen. Die Konzentrierung von affinitätsgereinigten Proben durch Ultrafiltration führte zu stark erhöhter DDM-Konzentration, die den Bilayer zerstörte. Versuche zur Entfernung von Detergenzien durch Dialyse oder Biobeads führten zur Präzipitation des Proteins. Zur Erhöhung der Ausbeute wurden daher die Synthesebedingungen im Weizenkeimextrakt optimiert.

3.4 Optimierungen der K2P-Synthese im Weizenkeimextrakt

3.4.1 Zusatz von Detergenzien

Nozawa et al. (2007) testeten verschiedene Detergenzien im zellfreien Weizenkeimsystem und konnten mit Hilfe der Brij-Reihe einen pflanzlichen Transporter in funktioneller Form produzieren. Analog zur Testung im *E. coli*-Extrakt wurden daher Versuche mit den nichtionischen Detergenzien Brij 35, Brij 58, Brij 78 und Brij 98 (Polyoxyethylenether), Triton X-100 (Octylphenoethoxylat), DDM (Alkylmaltosid), Digitonin (Steroidglykosid) sowie dem anionischen Steroid Natriumdesoxycholat durchgeführt. Die positive Wirkung der Brij-Detergenzien auf die Kanalproduktion konnte jedoch nicht reproduziert werden. Die Detergenzien wurden nicht von der zellfreien Reaktion toleriert, so dass keine Proteinsynthese nachweisbar war. Ebenso inhibierten Triton X-100 und DDM die Reaktion. Natriumdesoxycholat führte nicht zu einer Verbesserung der bisherigen Syntheseergebnisse und behinderte die nachfolgenden Reinigungsschritte durch eine hohe Viskosität. Die für das zellfreie *E. coli*-Extrakt gängige Methode des Detergenzuzusatzes konnte nicht auf das Weizenkeimsystem übertragen werden und wurde nicht weiter verfolgt.

3.4.2 Zeitverlauf, Temperaturpräferenz und Nachgabe von Reaktionsbestandteilen in der zellfreien Expression

Eine niedrigere Temperatur ist bei der rekombinanten Expression von Proteinen oft förderlich, um den Anteil funktionellen Proteins am Gesamtprotein zu erhöhen (Vera et al., 2007). Daher wurde die Reaktionstemperatur auf 17 °C reduziert. Der Reaktionsverlauf bei Raumtemperatur und 17 °C wurde durch stündliche Quantifizierung der Fluoreszenz im Plattenlesegerät verfolgt (Abb. 21A). Die Fluoreszenzintensitäten erreichten nach ~18 h eine Sättigung mit einem Zuwachs um nur noch 2,6 % ± 1,0 % (Raumtemperatur) bzw. 3,2 % ± 1,0 % (17 °C) in den letzten vier Messungen. Die bei 17 °C inkubierte Reaktion erreichte also eine um ~11 % höhere relative Fluoreszenzintensität (als Indikator für den Anteil richtig gefalteten Kanalproteins) als jene bei Raumtemperatur. Zukünftige Synthesen wurden entsprechend gekühlt durchgeführt.

Bei der zellfreien Synthese in größerem Maßstab kommen Produktionsverfahren zum Einsatz, die zur Verlängerung der Reaktionsdauer RNS und eventuell Energiesubstrate und Aminosäuren nachfüllen (z.B. Beebe et al. (2011)). Dies kann aber auch für Einzelreaktionen erfolgversprechend sein (Jarecki et al., 2013), da der RNS-Abbau ein limitierender Faktor für die Reaktionsdauer ist. Eine Nachgabe von RNS nach 24 h Reaktionszeit wirkte sich im vorliegenden System kaum positiv aus (Abb. 21B). Das Plateau nach 42 h bis 46 h erreichte lediglich eine 5,2 % ± 2,5 % höhere Fluoreszenzin-

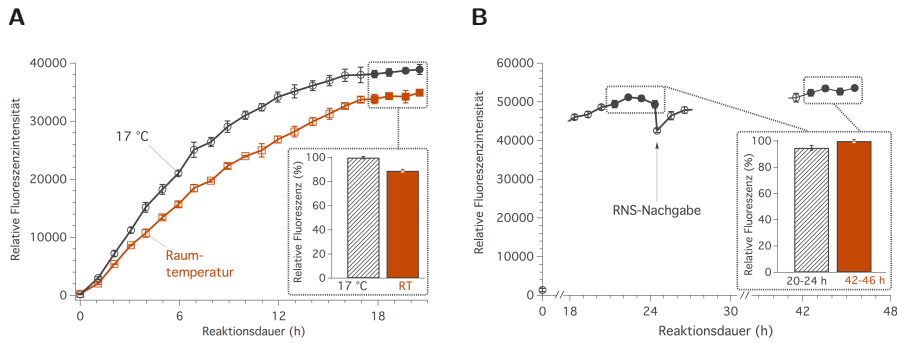


Abbildung 21: Zeitverlauf und Temperaturpräferenz der zellfreien Synthese im Weizenkeimextrakt. **A** Die zellfreie Synthese von *r*TREK1-GFP war bei 17 °C effizienter als bei Raumtemperatur und nach 18 h Reaktionsdauer abgeschlossen. Die Teilabbildung zeigt die mittleren Fluoreszenzintensitäten der eingerahmten höchsten Werte nach 18 h bis 21 h Reaktionszeit, normiert auf die mittlere Fluoreszenz bei 17 °C (17 °C schwarz schraffiert, Raumtemperatur orange gefüllt). **B** Die erneute Zugabe von RNS nach 24 h (Pfeil) zur Verlängerung der Reaktionsdauer führte nicht zu deutlicher Mehrausbeute. Die Teilabbildung zeigt die mittlere Fluoreszenz der Plateaus nach 20 h bis 24 h (schwarz schraffiert) und 42 h bis 46 h (orange gefüllt). Beide Versuche n=2 mit Doppelbestimmung, Daten \pm Standardabweichung.

tenzität als bei 20 h bis 24 h Reaktionszeit. Da bei dieser verlängerten Inkubationszeit auch Proteolyse und Aggregation auftreten könnten, wurde diese Nachfütterung der Reaktion nicht weiter angewendet und die Reaktionszeit bei etwa 18 h bis 20 h belassen.

3.4.3 Zellfreie Synthese unter Zusatz von großen unilamellaren Vesikeln (GUV)

Der Zusatz von Lipiden in Form von Liposomen, gemischten Mizellen oder proteinumgrenzten Lipiddoppelschichten (Nanodiscs) zur Verbesserung der Membranproteinsynthese, zur Stabilisierung des gefalteten Zustands und zur Verwendung in künstlichen Membransystemen wurde beispielsweise für pflanzliche Transporter (Nozawa et al., 2011) und Modellproteine wie den viralen Kaliumkanal K_{cv} beschrieben (Braun et al., 2014). Der im Folgenden dargestellte Lipidzusatz in Form von GUV und SUV konnte die mögliche Ausbeute von $80 \mu\text{g ml}^{-1}$ bis $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ auf Konzentrationen von etwa $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ bis $220 \mu\text{g ml}^{-1}$ Extrakt verbessern. Daneben ermöglichte er auch die begrenzte Lagerung bei 4 °C zur späteren elektrophysiologischen Messung.

Mit der Absicht, diese im Port-a-Patch-System verwenden zu können, wurden den zellfreien Reaktionen verschiedener K2P-Kanäle zunächst durch Elektroformation hergestellte und in Reaktionspuffer überführte DPhPC-GUV zugesetzt (Abschnitt 2.2.4, Seite 30). In Abb. 22 ist ein SDS-PAGE-Gel nach Auftrennung der rohen Reaktionsmischungen und Silberfärbung gezeigt. Bemerkenswerterweise konnte neben den schon

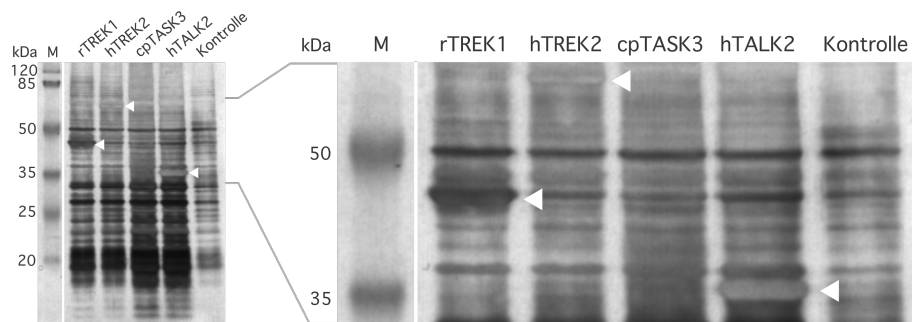


Abbildung 22: GUV-Zusatz verbessert die Ausbeute der zellfreien Synthese von K2P-Kanälen im Weizenkeimextrakt. In Anwesenheit von GUV wurde neben *rTREK1*- und *hTREK2*-Protein auch *hTALK2*-Protein in detektierbarer Menge synthetisiert. Zur Entfernung des Lipids wurden die Proben einer Acetonfällung unterzogen. Weiße Pfeile markieren die Banden der Monomere bei 47 kDa, 60 kDa und 37 kDa; M, Molekulargewichtsstandard nach UV-Aktivierung; vergrößerte Darstellung rechts.

erfolgreich synthetisierten Kanälen *rTREK1* und *hTREK2* nun auch *hTALK2* identifiziert werden, der im initialen Test nicht zu sehen gewesen war. Dieser soll in dieser Arbeit nicht weiter behandelt werden, hebt jedoch die deutlich verbesserten Syntheseleistung durch Zusatz von Lipiden hervor. Alle Banden waren ohne vorhergehende Reinigung im SDS-PAGE-Gel detektierbar und lagen im Bereich ihrer erwarteten Molekulargewichte.

3.4.4 GUV erlauben Beobachtung und Abschätzung der Orientierung von K2P-Kanälen

K2P-Kanäle insertieren in die GUV-Membran. Um nachzuweisen, dass Kanalproteine während der zellfreien Reaktion in die GUV-Membran insertieren, wurde das *rTREK1*-GFP-Fusionsprotein synthetisiert und konfokale Fluoreszenzaufnahmen angefertigt (Abb. 23). Die Überlagerung der Interferenzkontrast- und Fluoreszenzbilder zeigte die Kolokalisation des GFP-Fluoreszenzsignals mit der GUV-Membran (Abb. 23A rechts). Zusätzlich verdeutlicht Abb. 23B, dass die durchschnittliche Größe der GUV durch die notwendige Umpufferung und die Inkubation in der Reaktionsmischung abgenommen hat. Als GUV werden in der Regel unilamellare Liposomen mit einer Größe von bis zu 100 μm bezeichnet, wobei in der Elektroformation meist Durchmesser von etwa 30 μm bis 60 μm beobachtet wurden.

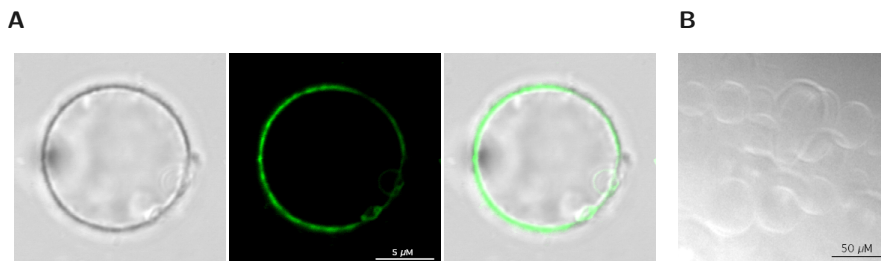


Abbildung 23: *r*TREK1-GFP-Kanäle inserieren in die GUV-Membran. **A** Nach der zellfreien Reaktion ist *r*TREK1-GFP-Fluoreszenz entlang der GUV-Membran sichtbar. Konfokale Aufnahme (400x) in verdünnter Reaktionsmischung, links Differential-Interferenzkontrast (DIC), Mitte Fluoreszenzkanal, rechts beide Kanäle übereinandergelegt. **B** GUV vor der zellfreien Synthese am Rand eines Tropfens (Phasenkontrast, 200x).

In GUV sind *r*TREK1-GFP-Kanäle größtenteils mit dem Carboxyterminus nach außen orientiert

Welche Orientierung haben die während der zellfreien Reaktion in die GUV-Membran inserierten Kanäle? Zur Untersuchung der Orientierung wurde die in den GFP-Fusionskonstrukten vorhandene TEV-Schnittstelle ausgenutzt, die nur bei einer Orientierung mit dem C-Terminus nach außen zugänglich für TEV-Protease sein konnte (Abb. 24A). Im Anschluss an die zellfreie Synthese wurden GUV mit *r*TREK1-GFP-Kanälen mit dieser Protease inkubiert. Nach 1 h, 2 h, 3 h und 15 h wurden Proben entnommen und durch Zentrifugation in Pellet und Überstand getrennt. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE wurde die Intensität der fluoreszierenden Banden ausgewertet (vgl. Abschnitt 2.2.4, Seite 32).

Abb. 24B zeigt die Fluoreszenzbanden nach Proteaseinkubation. Ungeschnittenes *r*TREK1-GFP in den GUV wurde im Pellet erwartet, freigesetztes GFP im Überstand. Die *r*TREK1-GFP-Fluoreszenz ließ sich durch die verwendeten Zentrifugationsgeschwindigkeiten offenbar nicht vollständig sedimentieren. Möglicherweise wurde ein gewisser Teil des Kanalproteins durch stark verkleinerte Vesikel oder endogene Lipide in Lösung stabilisiert. Für das konzentrierte Weizenkeimextrakt kann die Angabe von 725 mM endogener Phospholipide gefunden werden (persönliche Kommunikation mit Jacob Ludington zitiert in Beebe et al. (2011)). Die Fluoreszenzintensitäten von Pellet und Überstand wurden in Abb. 24C daher gemeinsam betrachtet. Die Fluoreszenzintensität der Bande bei einem scheinbaren Molekulargewicht von ~ 60 kDa (*r*TREK1-GFP-Protein, erwartet ~ 75 kDa) nahm im Verlauf der Inkubation von 100 % auf $25\% \pm 7\%$ ab. Umgekehrt erhöhte sich die Bandenintensität für GFP bei scheinbaren 35 kDa (erwartet ~ 28 kDa) auf $77\% \pm 6\%$. Zwischen 3 h und 15 h fand keine Veränderung mehr statt, was dafür spricht, dass keine zusätzliche Freisetzung von GFP durch Zusammenbruch der GUV und Exposition der *intra*-GUV C-Termini erfolgte und die proteinhaltigen GUV über einen längeren Zeitraum stabil waren.

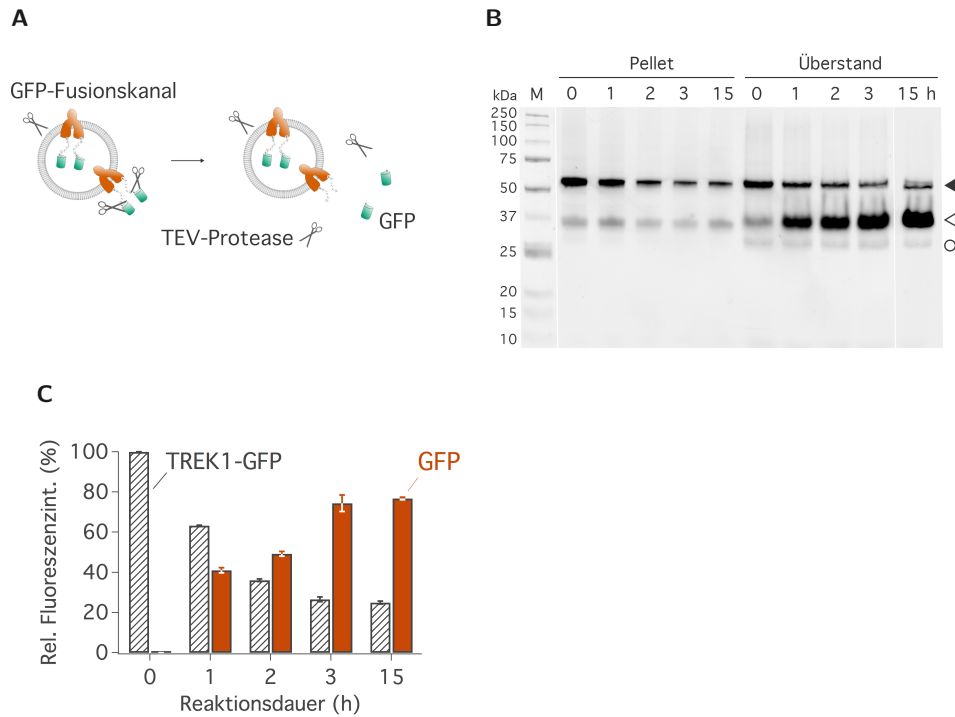


Abbildung 24: In GUV ist der Carboxyterminus von *r*TREK1-GFP-Kanälen überwiegend nach außen orientiert. **A** Prinzip des Proteolyseexperiments. Befindet sich der Carboxyterminus des Fusionsproteins außerhalb des GUV, ist die TEV-Proteaseschnittstelle zugänglich und die TEV-Protease kann GFP freisetzen. **B** Fluoreszenzbanden nach SDS-PAGE mit zusätzlicher Separierung in Pellet und Überstand. Sichtbar sind *r*TREK1-GFP-Monomere (Pfeil), freigesetztes GFP (offener Pfeil) sowie als Nebenprodukt der zellfreien Reaktion entstandenes lösliches GFP (offener Kreis). **C** Abnahme der relativen *r*TREK1-GFP-Fluoreszenzintensität nach Schnitt des GFP-Fusionspartners durch TEV-Protease und parallel Fluoreszenzzunahme durch freigesetztes GFP im Überstand. Die Daten wurden um die GFP-Fluoreszenz zum Zeitpunkt $t = 0$ korrigiert; Doppelbestimmung, Daten \pm Standardabweichung.

Die als schwache Bande auch bei $t = 0$ sichtbare Fluoreszenz von löslichem GFP ist ein häufig beobachtetes Phänomen bei der zellfreien Expression von GFP-Fusionsproteinen (Müller-Lucks et al., 2012). Das Konstrukt enthält kein alternatives Startcodon für GFP. Eine Translationsinitiation bei M79 ergäbe kein fluoreszierendes Produkt, da der Fluorophor aus den Residuen 65-67 (Serin, Dehydrotyrosin, Glycin) besteht. Eventuell liegt eine alternative nicht-AUG-Initiation z.B. an ACG vor, die in Weizen häufig ist (Kozak, 1989), oder es muss eine limitierte Proteolyse angenommen werden.

Etwa drei Viertel der Kanäle waren also mit dem C-Terminus nach außen orientiert und die TEV-Schnittstelle zugänglich.

3.5 Untersuchung von zellfrei synthetisierten *r*TREK1-GFP-Einzelkanälen in GUV durch verschiedene elektrophysiologische Methoden

Messungen an planaren künstlichen Membranen Die Funktion der *r*TREK1-GFP-Kanäle in GUV wurde in den planaren künstlichen Membranen von Port-a-Patch und Orbit elektrophysiologisch untersucht (Abb. 20 f; Beschreibung der Systeme siehe Abschnitt 2.5.3, Seite 41). Zur Membranbildung im Port-a-Patch-System (Abb. 25A) werden präformierte, leere DPhPC-GUV auf den Glaschip mit Apertur gegeben und durch Unterdruck angesogen. Sie bildeten nach Bersten in etwa 70 % der Versuche ein *Seal*. Auf gleiche Weise können proteinhaltige GUV zur Membranbildung verwendet werden. Die Wahrscheinlichkeit, mit einem solchen GUV einen *Bilayer* herzustellen, war allerdings sehr klein und keine Membran ermöglichte eine Messung. Im Orbit-System (Abb. 25B) wird eine künstliche Membran aus einer Lipid-Oktan-Mischung hergestellt. Ein Vorteil der Orbit und Orbit 16-Systeme ist die parallele Formierung von *Bilayern* über vier bzw. sechzehn Mikrokavitäten, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit, eine Fusion zu beobachten, erhöht. Auch hier konnte keine Insertion in die lösungsmittelhaltige Membran detektiert werden.

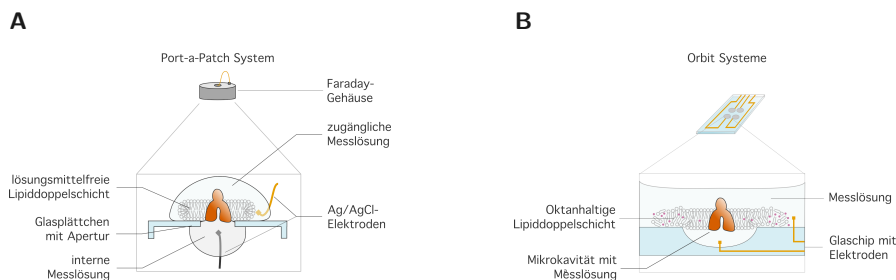


Abbildung 25: Aufbau der Systeme für planare (horizontale) *Bilayer*. **A** Port-a-Patch mit lösungsmittelfreier Membran formiert aus GUV, mit der Möglichkeit der Verwendung unterschiedlicher intra- und extrazellulärer Messlösungen. **B** Orbit mit aus Lipid-Oktan-Gemisch hergestellter lösungsmittelhaltiger Membran auf Chip mit eingebetteten Elektroden. Die Messlösung in der Mikrokavität ist nach Membranformation nicht austauschbar.

Elektrophysiologische Messung von *r*TREK1-GFP-Einzelkanälen in *Patch-Clamp*-Technik Mit einem klassischen *Patch-Clamp*-Versuchsaufbau mit Pipette (Abb. 26 und Abschnitt 2.5.2, Seite 41) konnten Messungen durchgeführt werden, die die Existenz von funktionsfähigen *r*TREK1-GFP-Einzelkanälen in den GUV bewiesen (Abb. 20 g). Zunächst wurde versucht, GUV in der Ganzzell-Konfiguration zu messen. Reine GUV formierten mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 40 % ein *Seal*, proteinhaltige GUV hingegen bildeten keines aus.

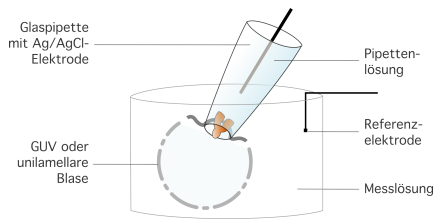


Abbildung 26: Patch-Clamp-Versuchsaufbau zur Messung von GUV und unilamellaren Blasen. Eine Glaspipette diente zur Formierung eines *Seals* an GUV oder an durch hypertonen Puffer hergestellten unilamellaren Blasen. GUV und Blasen wurden dabei zerstört. Der *Patch* ermöglichte die Messung von Einzelkanälen. Pipetten- und Badlösung enthielten symmetrisch 200 mM KCl.

Dies lag möglicherweise an unspezifisch an das GUV gebundene Protein (Long et al., 2012), welches den Kontakt der Glaspipette zur Membran und die Bildung des *Seals* verhinderte. Versuche, solche Anhaftungen durch Waschen mit alkalischer Natriumcarbonatlösung oder einem Puffer hoher Salzkonzentration abzulösen, wie es zur Entfernung peripherer Membranproteinen beschrieben ist (Kim et al., 2015), führten nicht zum Erfolg. Schließlich wurden die proteinhaltigen GUV ähnlich wie in Brohawn et al. (2014) beschrieben partiell auf einem frischen Lipidfilm getrocknet und durch hypertonen Puffer zur Ausbildung von unilamellaren Blasen gebracht, deren Membran weniger Anhaftungen aus der zellfreien Reaktion und ein höheres Lipid/Protein-Verhältnis haben sollte (vgl. Abschnitt 2.5.2, Seite 41).

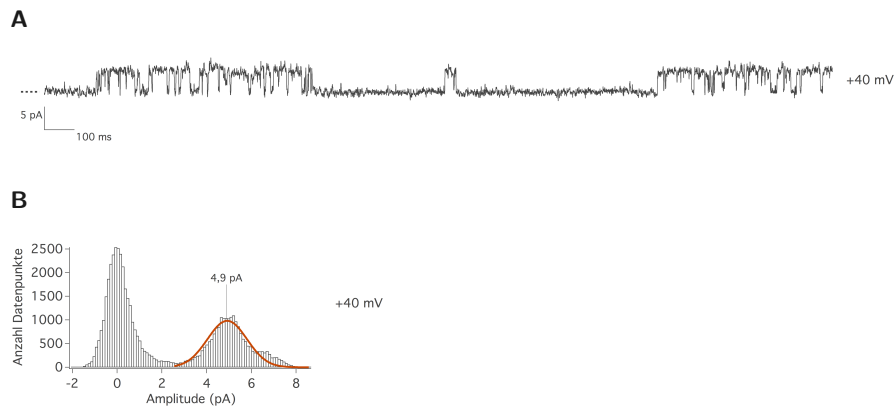


Abbildung 27: *rTREK1-GFP*-Einzelkanalstrom im GUV. **A** Einzelkanalstrom von *rTREK1-GFP* gemessen mit der *Patch-Clamp*-Technik an einer unilamellaren Blase in symmetrischen Lösungen (120 mM KCl, pH 7,4) bei einem Haltepotenzial von +40 mV und einer Abtastfrequenz von 20 kHz, gefiltert mit 1 kHz. **B** Histogramm aller Datenpunkte aus der Messung in **A** mit mittlerer Amplitude von $\sim 4,9$ pA.

Diese Blasen bildeten in etwa 20 % der Fälle ein *Seal*, das aber meist keinen Kanal

enthielt. In etwa sechzig dieser *Seals* konnten drei Kanäle in sechs Messungen beobachtet werden. Eine Beispielmessung ist in Abb. 27A gezeigt. Die Einzelkanalströme hatten in symmetrischer 120 mM KCl-Lösung bei +40 mV eine mittlere Amplitude von $\sim 4,9$ pA (Abb. 27B). Weitere Messungen bei -80 mV ergaben eine mittlere Amplitude von $\sim 2,5$ pA. Die Offenwahrscheinlichkeit der *rTREK1*-GFP-Kanäle lag bei 0,45. Mit dem *Patch-Clamp*-Verfahren konnten funktionelle *rTREK1*-GFP-Kanäle nachgewiesen werden, die Messungen waren jedoch zu instabil für weitergehende Untersuchungen.

3.6 Elektrophysiologische Messung von zellfrei synthetisierten *hTREK2*- und *hTREK2*-GFP-Einzelkanälen in SUV

3.6.1 Zellfreie Synthese unter Zusatz von kleinen unilamellaren Vesikeln (SUV) und Reinigung der Proteoliposomen

Bei der Rekonstitution von Membranproteinen in Lipidvesikel oder künstliche Membranen kann je nach Anwendung ein weiter Bereich von Lipid/Protein-Verhältnissen sinnvoll sein (Rigaud et al., 1995). Ein hoher Proteinanteil (Gewichtsverhältnis Lipid/Protein ~ 1 bis 5) wird zum Beispiel zur Kristallisation in Membranen, ein Lipid/Protein-Verhältnis von ~ 50 bis 200 für Untersuchungen in Proteoliposomen wie beispielsweise Transport- und Effluxversuche verwendet. Fusionen von Vesikeln mit Membranen erfordern einen höheren Lipidanteil. Für Einzelkanalmessungen werden Verhältnisse von ~ 1000 bis 3000 (Lipid/Protein) angegeben (siehe z. B. Jo et al. (2017)).

Um zu überprüfen, ob das Lipid/Protein-Verhältnis ursächlich für die fehlende Fusion von GUV mit künstlichen Membranen ist, wurden infrarotspektroskopische ATR-Messungen durchgeführt. Dabei kann über das Intensitätsverhältnis von Carbonylbanden (Lipide) und Amidbanden (Proteine) auf das Lipid/Protein-Verhältnis geschlossen werden (Abschnitt 2.2.4, Seite 32). Das spektroskopische Lipid/Protein-Verhältnis lag bei $\sim 0,33$ und war damit für eine erfolgreiche Fusion mit künstlichen Membranen zu niedrig. KcsA-Proteoliposomen mit einem spektroskopischen Lipid/Protein-Verhältnis von 4 zeigten in Experimenten von Dr.ⁱⁿ Ekaterina Zaitseva (Physiologisches Institut II, Universität Freiburg) gute Fusionseigenschaften mit künstlichen Membranen, bei einem Verhältnis unter 1 fusionierten die Proteoliposomen nicht (persönliche Kommunikation, 2016). Die Lipidkonzentration in der zellfreien Reaktion wurde daher durch Austausch der GUV gegen SUV aus der pflanzlichen Lipidmischung Asolectin erhöht, die in sehr viel höherer Konzentration hergestellt werden konnten (Abschnitt 2, Seite 31). Asolectin wurde erfolgreich zur Rekonstitution von Kaliumkanälen wie MscL, KcsA und KvAP (z.B. Perozo et al. (2002); Molina et al. (2004); Devaraneni et al. (2011)) verwendet und besteht aus einer Phospholipidmischung aus Phosphatidylcholin, -ethanolamin,

Phosphatidylinositol, Phosphatidsäuren sowie einem Anteil sonstiger Lipide. Zur Anreicherung der polaren Fraktionen wurde Asolectin vor der SUV-Herstellung mit Aceton extrahiert (Abschnitt 2.2.4, Seite 30).

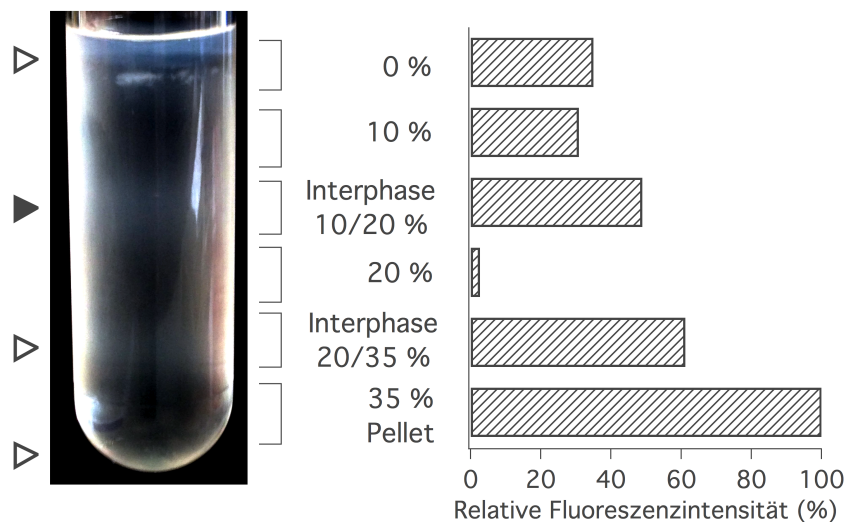


Abbildung 28: Anreicherung von Proteoliposomen mit funktionellen Kanälen durch diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation. Beispiel für eine Trennung von *hTREK2*-GFP-haltigen Liposomen nach der Ultrazentrifugation (links). Die Liposomen sind als schwache milchige Banden sichtbar (Pfeile). Nur Proteoliposomen der Interphase 10%/20% (gefüllter Pfeil) ermöglichten Messungen in künstlichen Membranen. Die Verteilung der relativen *hTREK2*-GFP-Fluoreszenzintensitäten normiert auf die Maximalfluoreszenz im Pellet nach Fraktionierung des Gradienten ist rechts dargestellt.

Da anzunehmen war, dass nicht alle SUV Kanalproteine enthalten, wurde eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung der Proteoliposomen eingesetzt (Abschnitt 2.2.4, Seite 31). Die Verteilung der Proteoliposomen nach Ultrazentrifugation in einem Sucrosegradienten konnte anhand der *rTREK1*-GFP-Fluoreszenz nachvollzogen werden (Abb. 28). Nur Proteoliposomen aus der Interphase von 10%/20% Sucrose führten in der Folge zu erfolgreichen und stabilen elektrophysiologischen Messungen. Die leichtere Fraktion enthielt überwiegend leere Liposomen, während aggregiertes Protein in den schwereren Fraktionen sedimentierte (Long et al., 2012). Für nicht durch diese Methode gereinigte Proteo-SUV wurden nur wenige und kurze Insertionen beobachtet und die künstlichen Membranen wurden schnell zerstört (Abb. 20 i). In SUV waren die untersuchten Kanäle nun für 1–2 Tage bei 4 °C lagerfähig und behielten ihre Aktivität auch nach Lagerung bei –80 °C.

3.6.2 Elektrophysiologische Messung von *h*TREK2- und *h*TREK2-GFP-Proteoliposomen in planaren künstlichen Membranen

Die Funktionalität des zellfrei hergestellten *r*TREK1-GFP konnte außer durch *Patch-Clamp*-Versuche an GUV auch durch Messungen an planaren künstlichen Membranen im Orbit-mini- und Orbit 16-System bewiesen werden (Abb. 20 h; Abschnitt 2.5.3, Seite 41). Während der Versuche wurden vier Insertionen in verschiedene *Bilayer* beobachtet. Zwei weitere enthielten mindestens zwei Kanäle und konnten nicht ausgewertet werden. Die Daten sind in Abb. 29 zusammengefasst und zeigen Kanäle mit Einzelkanalamplituden zwischen ~ -4 pA und ~ 9 pA im Spannungsbereich von -80 mV bis $+80$ mV. Allerdings waren die Messungen noch kurz und die Amplituden nicht über einen längeren Messzeitraum konstant, wie in Abb. 29A bei -80 mV sichtbar. Die Offenwahrscheinlichkeit in diesen Messungen lag zwischen 0,15 und 0,5 in den stabilen Abschnitten. Die beobachteten Einzelkanalamplituden bewegten sich im in der Literatur beschriebenen Bereich für *r*TREK1-Kanäle: Li et al. (2006) zeigten den als '*high conductance channel*' bezeichneten Kanal mit ~ -7 pA bis ~ 10 pA in diesem Spannungsbereich.

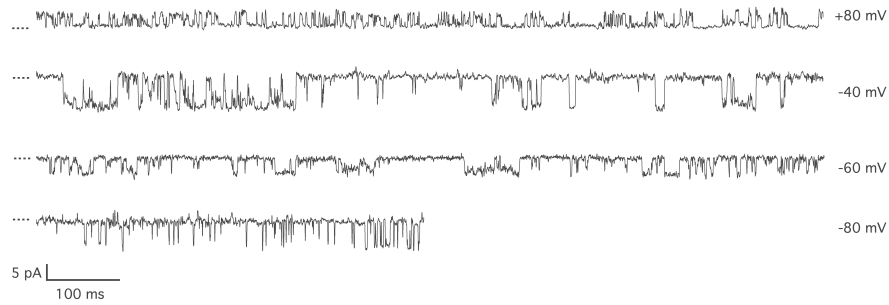
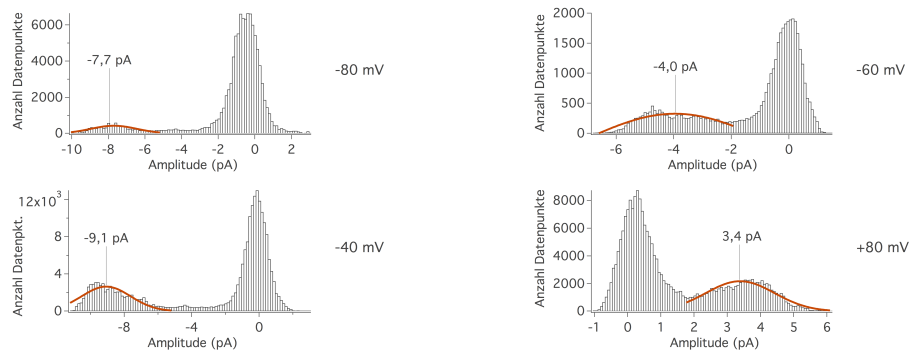
A**B**

Abbildung 29: Zusammenfassung erfolgreicher Einzelkanalmessungen von r TREK1-GFP in planaren künstlichen Membranen. A Einzelkanalstrom in planarer DPhPC-Membran bei verschiedenen Haltepotenzialen von -80 mV, -40 mV und $+80$ mV und einer Abtastfrequenz von 200 kHz, gefiltert mit 1 kHz aus dem Orbit16-System (symmetrisch 200 mM KCl, pH 7,4). Die Messung bei einem Haltepotenzial von -60 mV und einer Abtastfrequenz von 50 kHz, gefiltert mit 1 kHz stammt aus dem Orbit-mini-System mit gleicher Zusammensetzung von Membran und Messlösung. Die punktierten Linien deuten jeweils den geschlossenen Zustand an. Die Kanäle wurden nicht nach ihrer Orientierung sortiert, da keine Spannungssprünge durchgeführt wurden; die Potenzialangaben beziehen sich auf das Haltepotenzial während der Messung. **B** Die Histogramme aller Datenpunkte der in **A** gezeigten Messungen dienten mit einer Gauß-Kurvennäherung zur Abschätzung der Einzelkanalamplituden von r TREK1-GFP.

3.6.3 Elektrophysiologische Messung von *h*TREK2- und *h*TREK2-GFP-Proteoliposomen in vertikalen künstlichen Membranen

Mit Hilfe des gut exprimierbaren *r*TREK1-GFP-Konstrukts konnten bisher erste funktionelle Kanäle bestätigt, der Lipidzusatz zur zellfreien Synthesereaktion optimiert und ein Reinigungsprotokoll für Proteoliposomen entwickelt werden. Die gefundenen Optimierungen waren vollständig auf den *h*TREK2-Kanal und sein GFP-Fusionsprotein übertragbar. Diese konnten elektrophysiologisch charakterisiert werden.

Um die bisher limitierende Insertionswahrscheinlichkeit zu erhöhen, wurde ein Versuchsaufbau zur Messung von Einzelkanalaktivität in vertikalen künstlichen Membranen gewählt (siehe Abb. 30 und Abschnitt 2.5.4, Seite 43). Im Vergleich zu den bisher eingesetzten planaren Versuchsaufbauten mit Membrandurchmessern von 50 nm bis 200 nm in den Orbit-Systemen und etwa 1 μ m beim Port-a-Patch wurden in der Apertur des vertikalen Systems Lipiddoppelschichten mit einem Durchmesser von \sim 50 μ m bis 150 μ m gebildet, deren Nachteil jedoch ein höheres Rauschen ist. Künstliche Membranen wurden in symmetrischer Messlösung (200 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7,0 mit KOH/HCl) aus DPhPC in *n*-Oktan hergestellt. Nach Aufbringen der Lipidlösung auf die Apertur formierte sich innerhalb einiger Minuten eine Lipiddoppelschicht, deren Bildung durch eine steigende Kapazität verfolgt werden konnte (siehe dazu Abschnitt 2.5.4, Seite 44). Diese DPhPC-Membranen blieben für 5 min bis 30 min bestehen und konnten bei Reißen oft zwei bis drei Mal mit Hilfe einer Luftblase wiederhergestellt werden; ein insertierter Kanal ging dabei verloren.

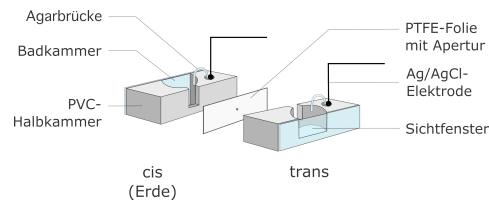


Abbildung 30: Versuchsaufbau für Experimente an vertikalen künstlichen Membranen. Die beiden Halbkammern enthalten die Messlösung und werden durch das Septum mit Apertur getrennt. Agarbrücken stellen die elektrische Verbindung zu dem Messelektroden her, die mit dem umgebauten Port-a-Patch verbunden sind. Ein Sichtfenster ermöglicht die Herstellung der künstlichen Membran unter stereomikroskopischer Kontrolle.

Sowohl mit *h*TREK2- als auch mit *h*TREK2-GFP-Proteoliposomen wurden Insertionen beobachtet (Abb. 20 j). Insertionen wurden durch Resuspendieren der Messlösungen und Zugabe der Proteo-SUV nahe des *Bilayers* begünstigt. In insgesamt etwa 440 hergestellten Membranen konnten insgesamt 7 Insertionen mit 20 auswertbare Messungen erhalten werden. Die Insertionsrate lag mit etwa 2 % noch immer niedrig, wobei ein-

schränkend zu erwähnen ist, dass eine Insertion meist erst nach ~ 10 min erfolgte und nicht alle Membranen so lange bestehen blieben. Da die einwärtsgleichrichtende Strom-Spannungs-Beziehung von TREK2-Einzelkanälen bekannt war, konnte die Kanalorientierung bei der Messung durch einen Spannungssprung von positiven zu negativen Potenzialen geprüft werden. Proteoliposomen wurden in die *trans*-Kammer pipettiert und die TREK2- und TREK2-GFP-Kanäle inkorporierten in 60 % der Fälle in *inside-out* Orientierung, also mit der cytoplasmatischen Seite Richtung *cis* (*ground*) in der whole-cell Konfiguration. In Abb. 31 sind Beispielströme von *h*TREK2- und *h*TREK2-GFP-Kanälen unter symmetrischen Bedingungen bei verschiedenen Haltepotenzialen gezeigt.

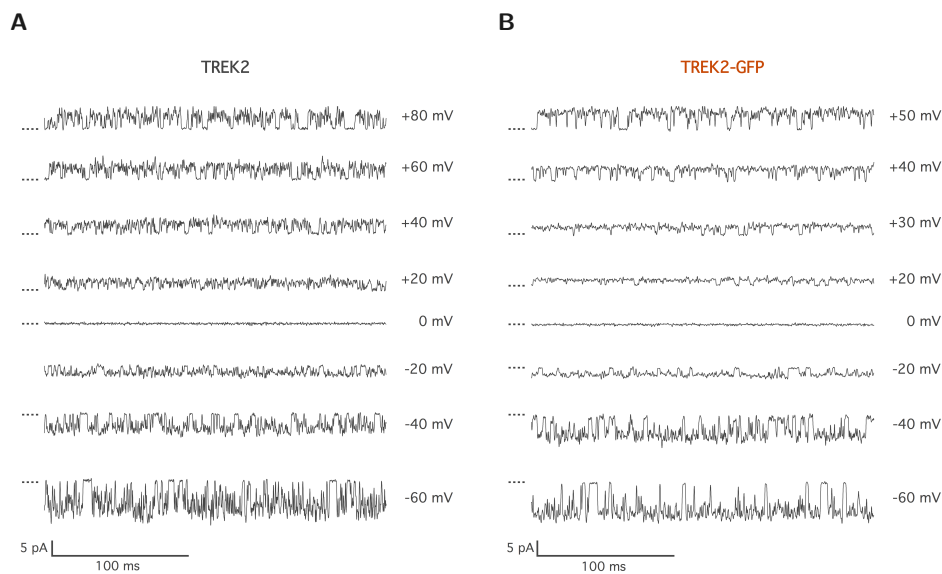


Abbildung 31: Ausschnitte von Einzelkanalmessungen von *h*TREK2- und *h*TREK2-GFP-Kanälen im vertikalen *Bilayer*. Einzelkanalstrom von *h*TREK2 (**A**) und *h*TREK2-GFP (**B**) bei verschiedenen Haltepotenzialen in symmetrisch 200 mM K^+ , pH 7, aufgezeichnet mit einer Abtastfrequenz von 20 kHz und gefiltert mit einem 1 kHz-Tiefpassfilter. Die punktierten Linien deuten den geschlossenen Zustand an.

In allen Messungen von *h*TREK2- und *h*TREK2-GFP-Proteoliposomen waren die Kanäle kontinuierlich aktiv. Beide Kanäle zeigten eine Einwärtsgleichrichtung, das heißt höhere Einzelkanalamplituden bei negativen Potenzialen. Es wurden keine offensichtlichen Zwischenzustände (*subconductance states*) beobachtet. In zwei Fällen wurden bis zu vier Kanäle aufgezeichnet, deren Amplituden aber nicht verlässlich getrennt werden konnten. Beide Messungen gingen nicht in die Analysen ein. In keiner Messung zeigte

sich eine Pore oder ein unerwarteter Strom, der auf die Insertion endogener Weizenkeimproteine hindeutete.

Ein Histogramm aus allen Datenpunkten einer Einzelkanalmessung (Rohdatenhistogramm) bietet einen Überblick über offene und geschlossene Zustände des Kanals. Diese Histogramme sind in Abb. 32A und Abb. 33A für Einzelkanalmessungen von *hTREK2*- und *hTREK2*-GFP-Kanälen bei verschiedenen negativen und positiven Potenzialen dargestellt. Sie enthielten zwei Hauptzustände, die durch die Summe zweier Gaußfunktionen näherungsweise beschrieben werden konnten. K2P-Kanäle zeigen bekanntermaßen ein flackerndes Einzelkanalmuster mit schnellem Öffnen und Schließen (Renigunta et al., 2015). Die Rohdatenhistogramme enthielten viele Messpunkte im Übergangsbereich zwischen den Maxima des geschlossenen und offenen Zustands. Dies verdeutlicht, dass die schnellen Schlüsse mit der verwendeten Abtastfrequenz und Filterung nicht aufgelöst werden konnten. Bei niedrigen positiven und negativen Spannungen mit geringen Einzelkanalamplituden war außerdem ein deutlicher Einfluss des Rauschens sichtbar.

Die Detektion der Einzelkanalereignisse erfolgte auf Basis der Maxima aus den Rohdatenhistogrammen. Aus den so idealisierten Daten wurden Amplitudenhistogramme erstellt, die in Abb. 32B und Abb. 33B präsentiert sind. Sie verdeutlichten die beiden Amplitudenstufen: den geschlossenen Zustand bei 0 pA und die durch eine Gauß-Kurvennäherung berechneten mittleren Amplituden für den geöffneten Zustand bei verschiedenen Spannungen. Es wurde nur ein offener Zustand angenommen. Die mittleren Einzelkanalamplituden für die verschiedenen Spannungen sind in den Histogrammen angegeben.

Die resultierende Strom-Spannungs-Beziehung (Abb. 34A) zeigt die einwärts gleichrichtenden Einzelkanalströme von *hTREK2* und *hTREK2*-GFP. *hTREK2*-Einzelkanäle wiesen Stromamplituden von $-4,2$ pA bei -40 mV und $2,75$ pA bei $+40$ mV auf. Die *hTREK2*-GFP-Kanäle besaßen Amplituden von $-4,8$ pA und $2,2$ pA (-40 mV/ $+40$ mV). Der Verlauf der Strom-Spannungs-Beziehung von *hTREK2*-GFP-Kanälen deckte sich in weiten Teilen mit derjenigen von *hTREK2*-Kanälen. Lediglich die Einzelmessung bei $+50$ mV zeigte eine etwas höhere Amplitude, die eventuell nicht dem wahren Wert entspricht und durch weitere Messungen geprüft werden muss. Vergleicht man die für beide Konstrukte gemessenen Spannungen von -60 mV bis $+40$ mV, unterscheidet sich die Stromgrößen nur um maximal $0,65$ pA (Messpunkt bei $+20$ mV).

Eine Analyse der Leitwerte ergab für *hTREK2*-Kanäle 106 pS \pm 2 pS bei -40 mV und 69 pS bei $+40$ mV. Beim *hTREK2*-GFP-Kanal ergaben sich 120 pS \pm 12 pS bei -40 mV und 54 pS bei $+40$ mV. Sie wichen nur wenig voneinander ab, wie Abb. 34B veranschaulicht.

Die Offenwahrscheinlichkeit p_o wurde aus den Amplitudenhistogrammen durch Auswertung des Flächeninhalts des offenen und geschlossenen Zustands berechnet und für

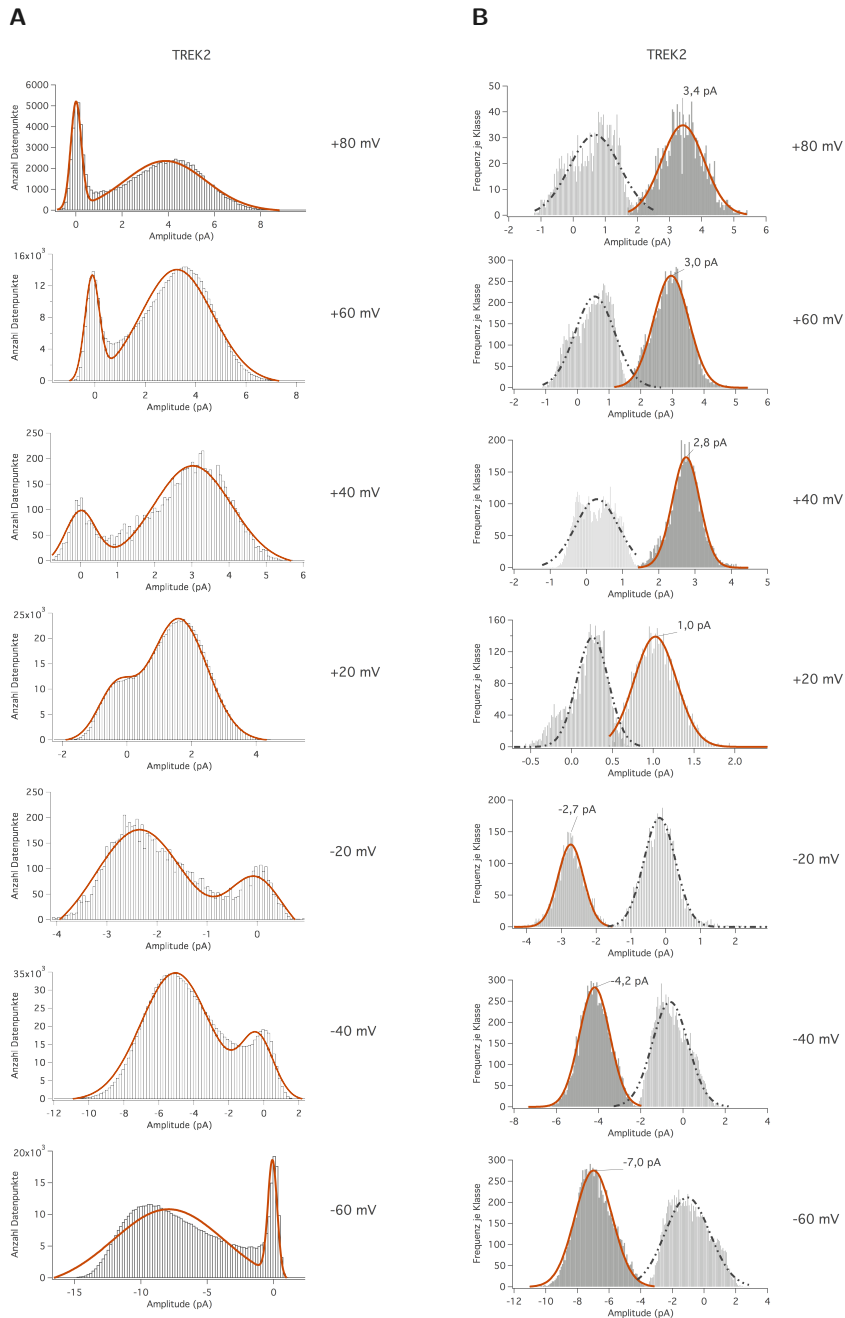


Abbildung 32: Histogramme der Einzelkanalmessungen von *hTREK2*-Kanälen. **A** Histogramme der gesamten Datenpunkte von Beispielmessungen bei Haltepotenzialen von -60 mV bis $+80$ mV mit Kurvenanpassung aus der Summe zweier Gaußfunktionen (orange durchgezogene Linie). **B** Die Amplitudenhistogramme zeigen nach Idealisierung den offenen und geschlossenen Zustand. Eine Gauß-Kurvenapproximation ergab die mittlere Amplitude der Kurvenanpassung in pA bei Spannungen von -60 mV bis $+80$ mV (geschlossen: schwarze Strichpunktlinie; offen: orange durchgezogene Linie).

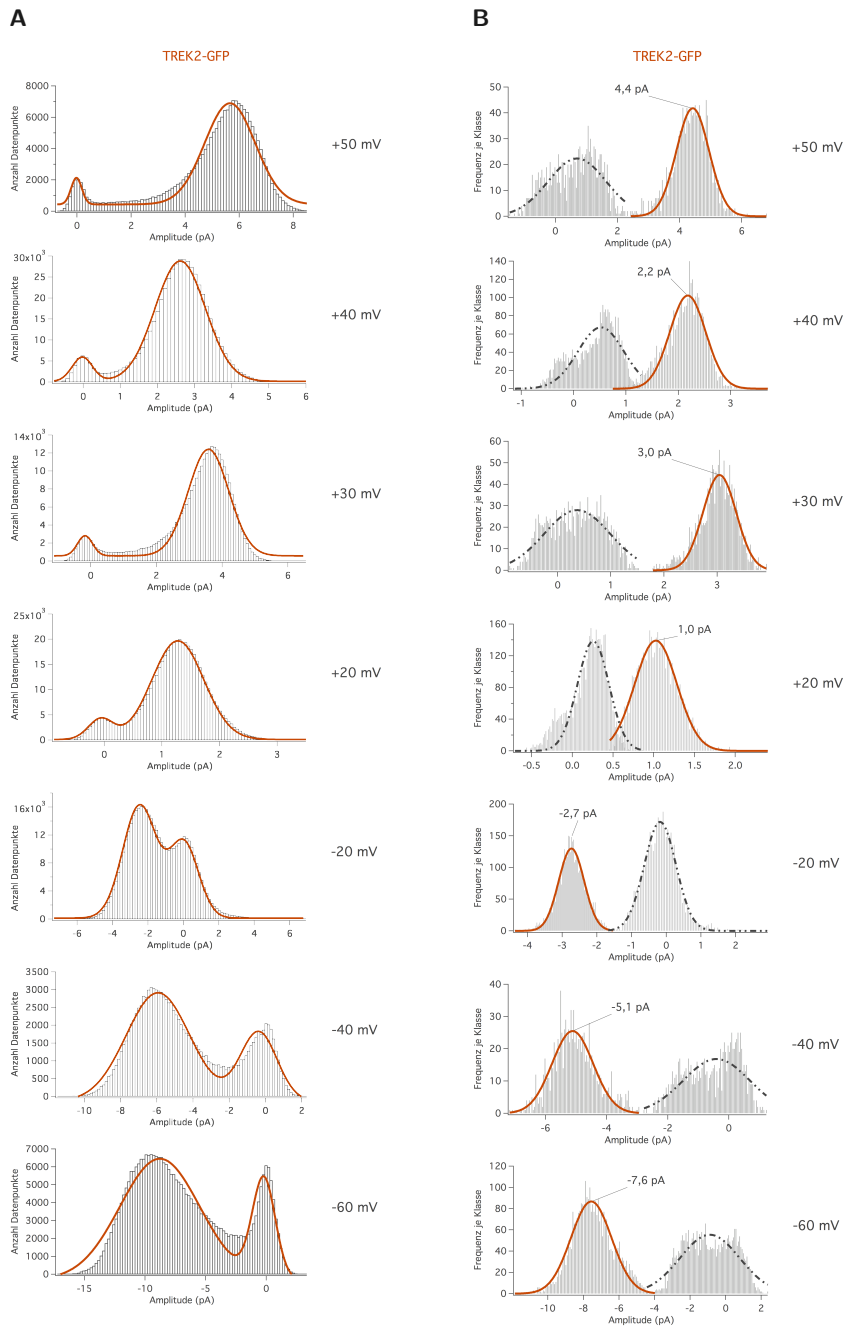


Abbildung 33: Histogramme der Einzelkanalmessungen von *hTREK2-GFP*-Kanälen. A Histogramme der gesamten Datenpunkte von Beispielmessungen bei Haltepotenzialen von -60 mV bis $+50$ mV mit Kurvennäherung aus der Summe zweier Gaußfunktionen (orange durchgezogene Linie). **B** Die Amplitudenhistogramme zeigen nach Idealisierung den offenen und geschlossenen Zustand. Eine Gauß-Kurvenapproximation ergab die mittlere Amplitude in pA bei Spannungen von -60 mV bis $+50$ mV (geschlossen: schwarze Strichpunktlinie; offen: orange durchgezogene Linie).

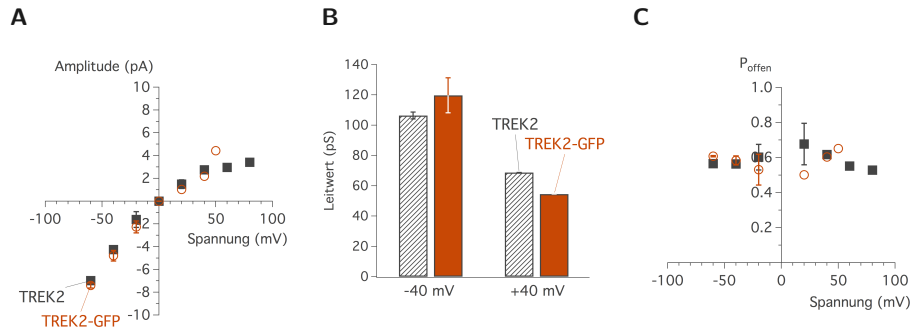


Abbildung 34: Strom-Spannungs-Beziehungen, Leitwerte und Offenwahrscheinlichkeiten der Einzelkanalmessungen von *hTREK2*- und *hTREK2*-GFP-Kanälen. **A** Strom-Spannungs-Diagramm erstellt aus den Gauß-Kurvennäherungen der Amplitudenniveaus aus Abb. 32B und Abb. 33B für *hTREK2*- und *hTREK2*-GFP-Kanäle. Messungen aus mehreren Membranen sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt (*hTREK2*-Ströme: $n=1$ für -60 mV, $+40$ mV, $+60$ mV und $+80$ mV, $n=2$ für -40 mV, -20 mV und $+20$ mV; *hTREK2*-GFP-Ströme: $n=1$ für $+20$ mV, $+40$ mV und $+50$ mV, $n=2$ für -60 mV und -40 mV, $n=3$ für -20 mV). **B** Vergleich der Leitwerte von *hTREK2* (schwarz schraffiert) und *hTREK2*-GFP (orange gefüllt) bei -40 mV und $+40$ mV berechnet aus den Strom-Spannungs-Beziehungen aus Abb. 34A unter der Annahme eines K^+ -Umkehrpotenzials von 0 mV in symmetrischen Messlösungen mit beidseitig 200 mM KCl. **C** Offenwahrscheinlichkeit von *hTREK2*- (gefüllte schwarze Quadrate) und *hTREK2*-GFP-Kanälen (orange offene Kreise) bei pH 7,0 berechnet aus den Rohdatenhistogrammen in Abb. 32B und Abb. 33B.

hTREK2- und *hTREK2*-GFP-Kanäle in Abb. 34C gegen die Spannung aufgetragen. Die Offenwahrscheinlichkeit liegt in den vertikalen künstlichen Membranen für beide Kanäle zwischen $0,5$ und $0,68$. Sie blieb über die Länge der Aufnahmen konstant. Für den *hTREK2*-Kanal ist ein leicht glockenförmiger Verlauf sichtbar, während die gefundenen Werte für das *hTREK2*-GFP-Fusionsprotein stärker streuen.

Die in künstlichen Membranen aus pflanzlichen DPhPC gefundenen Werte für Einzelkanalamplituden und Leitwerte stimmten gut mit Beschreibungen von heterolog exprimiertem *hTREK2*-Protein in Säugerzellen überein. Bang et al. (2000) bestimmten für in COS 7-Zellen exprimierte *hTREK2*-Kanäle Leitwerte von 110 pS \pm 9 pS bei -40 mV und 68 pS \pm 16 pS bei $+40$ mV. Die Kanäle zeigten auch die einwärtsgerichtete Charakteristik der Strom-Spannungs-Beziehung. Lesage et al. (2000) veröffentlichten ebenfalls für *hTREK2*-Kanäle COS 7-Zellen eine etwas weniger stark einwärtsrektifizierende Strom-Spannungs-Beziehung mit Leitwerten von 128 pS und 100 pS (-40 mV/ $+40$ mV). Vergleichbare Werte und derselbe Verlauf der Strom-Spannungs-Beziehung mit Einwärtsrektifizierung wurden für TREK2-Kanäle in nativen Zellen der Ratte beschrieben. Han et al. (2003) zeigten in magnozellulären sekretorischen Neuronen des Hypothalamus der Ratte einen Leitwert von 66 pS \pm 5 pS bei $+40$ mV. Kang und Kim (2006) stellten 50 pS \pm 7 pS bei $+60$ mV in Spinalganglien (DRG)-Neuronen der Ratte fest.

Hingegen unterschieden sich die in dieser Arbeit gefundenen Offenwahrscheinlichkeiten von den bisher für *h*TREK2-Kanäle beschriebenen Werten. Anders als in Bang et al. (2000) und Lesage et al. (2000) nahm die Offenwahrscheinlichkeit bei positiveren Potenzialen nicht zu. Für den makroskopischen Strom der hier untersuchten Kanäle bedeutet dies, dass eine leicht einwärtsrektifizierende Strom-Spannungs-Beziehung erwartet würde. Jedoch ist für die makroskopischen Ströme von *h*TREK2-Kanälen eine Auswärtsgleichrichtung bekannt (Lesage et al., 2000; Schewe et al., 2016).

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die zellfreie Synthese verschiedener vollständiger K2P-Kanäle und deren elektrophysiologische Charakterisierung. In dieser Arbeit habe ich am Beispiel von TREK1- und TREK2-Kanälen gezeigt, dass eine zellfreie Expression funktioneller humaner K2P-Kanäle im Weizenkeimextrakt möglich ist und diese in verschiedene liposomale Umgebungen (GUV und SUV) insertieren. Im folgenden werde ich die zellfreie Synthese und die elektrophysiologischen Eigenschaften der auf diese Weise hergestellten Kanäle diskutieren.

4.1 Charakterisierung der GFP-Fusionsproteine als geeignete Fluoreszenzmarkierung für K2P-Kanäle

Für *r*TREK1 und *h*TREK2 wurden GFP-Fusionskonstrukte zur Fluoreszenzmarkierung hergestellt. Die C-terminal mit GFP verbundenen Kanäle dienten der vereinfachten Optimierung der Synthesebedingungen, als Faltungsindikator sowie zur Feststellung der Orientierung der Kanäle in der GUV-Membran. Die TREK-Fusionsproteine wurde zunächst in *Xenopus-laevis*-Oocyten und HEK 293-Zellen exprimiert und unter verschiedenen Aspekten mit dem Wildtypkanal verglichen (vgl. Abschnitt 3.2, Seite 50).

Der *r*TREK1-GFP-Kanal war in *Xenopus-laevis*-Oocyten und HEK 293-Zellen in der Membran lokalisiert. In TEVC-Messungen an *Xenopus-laevis*-Oocyten unterschied sich die Strom-Spannungs-Kurve von *h*TREK2- und *h*TREK2-GFP-Kanälen nicht. Die extrazelluläre pH-Aktivierung des GFP-Fusionsproteins war im Vergleich zum Wildtypkanal unverändert. Auch die Inhibition durch Rutheniumrot wirkte am GFP-Fusionskanal. Dies deutete darauf hin, dass der Selektivitätsfilter-Schaltmechanismus für diese Stimuli in den GFP-fusionierten Kanälen intakt war (Sandoz et al., 2009; Zhuo et al., 2015). Die Funktion des Carboxyterminus als regulatorische Domäne für das Schalten am Selektivitätsfilter wurde durch einen Aktivator (2-APB) überprüft, dessen Bindungsregion im C-Terminus im Bereich von H368 liegt (Zhuo et al., 2015). *h*TREK2- und *h*TREK2-GFP-Kanäle waren gleichermaßen mit 2-APB aktivierbar. Eine Entkopplung des Carboxyterminus durch die GFP-Fusion mit Behinderung der Übertragung des Stimulus auf das Selektivitätsfilter *gate* lag folglich nicht vor. Des weiteren entsprachen auch die Resultate der später diskutierten Einzelkanalmessungen von GFP-Fusionskanälen bezüglich Einzelkanalamplituden, Leitwerten und Offenwahrscheinlichkeit denen, die für nicht markierte TREK2-Kanäle erhoben wurden (siehe Abschnitt 3.6.3, Seite 75).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die GFP-Fusion am C-Terminus keinen Einfluss auf die elektrophysiologischen Einzelkanaleigenschaften von TREK-Kanälen hat. Sie kann als geeignete, genetisch kodierte Fluoreszenzmarkierung wahrscheinlich auch für andere K2P-Kanäle genutzt werden.

4.2 Wahl des zellfreien Systems und Expression von K2P-Kanälen im Weizenkeimextrakt

Drei verschiedene zellfreie Systeme wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, K2P-Proteine zu synthetisieren. Zur Beurteilung des korrekten Faltungszustands und zur Quantifizierung der Ausbeute wurden TREK-GFP-Fusionen verwendet. Zur Erhöhung der Ausbeute wurden verschiedene Zusätze wie Detergenzien und Liposomen und verschiedene RNS-Präparationen eingesetzt (siehe Abschnitt 3.3, Seite 55).

Das prokaryotische zellfreie Extrakt aus *E. coli* synthetisierte auch unter Zusatz von Detergenzien keinen der untersuchten fluoreszenzmarkierten K2P-Kanäle (*h*TRAAK-GFP, *r*TREK1-GFP und *cp*TASK3-GFP).

Im Tabakzellextrakt konnte hingegen TREK2-GFP-Protein hergestellt werden. Bei Einsatz von RNS war die Ausbeute wie von Buntru et al. (2014) beschrieben deutlich abhängig von einer m⁷G-Kappe. RNS ohne Kappe führte bei gleicher absoluter RNS-Menge nur zu einem zwanzigstel der Ausbeute an fluoreszierendem Kanalprotein. Weiterhin reagierte das Extrakt empfindlich auf Ionen aus der Nukleinsäurereinigung und tolerierte keine Ammoniumfällung der RNS. Die nach Buntru et al. (2015) als gekoppelte Transkription/Translation mit Plasmid-DNS ausgeführten Reaktionen synthetisierten etwa halb so viel fluoreszierendes Kanalprotein wie die Reaktion mit kappentragender RNS (vgl. Abb. 15, Seite 57). Das Weizenkeimsystem war fähig, verschiedene K2P-Kanalproteine zu synthetisieren, von denen hier die *r*TREK1-Kanäle, *h*TREK2-Kanäle und ihre GFP-Fusionen präsentiert wurden. Weitere erfolgreich produzierte Kanäle waren *h*TALK2, *cp*TASK3, *h*TRESK, *h*THIK1 und *h*TRAAK. Die Synthese im Weizenkeimextrakt lieferte doppelt so viel TREK-GFP-Protein wie die leistungsfähigste Reaktion im Tabakzellextrakt (vgl. Abb. 19, Seite 61).

Das kommerzielle Weizenkeimextrakt (WEPRO, CellFree Sciences) erwies sich für die beabsichtigte Produktion von K2P-Kanälen somit als das überlegene System und es wurde zur Durchführung der Experimente in dieser Arbeit verwendet. Die Expressionsversuche im Tabakzellextrakt sind trotzdem als vielversprechend zu bezeichnen, da es selbst hergestellt werden kann. Die Anzucht großer Volumina BY 2-Tabakzellen ist einfacher als die Verarbeitung von Weizenkeimen und günstiger als der Erwerb des kostenintensiven kommerziellen Weizenkeimextrakts. Das Tabakzellextrakt würde sich zur Synthese von K2P-Kanälen eignen, da die geringere Translationseffizienz durch eine entsprechende Erhöhung des Reaktionsvolumens kompensiert werden könnte. Auch der gekoppelte Transkriptions/Translationsmodus mit etwa halb so großer Ausbeute ist interessant, um die *in-vitro*-Synthese kappentragender RNS zu vermeiden.

Optimierte Synthese im Weizenkeimextrakt Im Weizenkeimextrakt wurden Proteinmengen erhalten, die eine Reinigung durch Affinitätschromatographie im kleinen Maß-

stab erlaubten und durch Fluoreszenz, Silberfärbung und Immunodetektion nachgewiesen werden konnten (vgl. Abb. 16, Seite 58). Die korrekt gefaltete Subpopulation der zellfrei produzierten TREK-Kanäle wurde anhand ihrer GFP-Fluoreszenz quantifiziert. Zwei Drittel der Gesamtausbeute lagen in korrekter Faltung vor (vgl. Abb. 18, Seite 60). Ohne Syntheseabbruch entstandene Kanäle konnten durch die Fluoreszenz des C-terminal fusionierten GFP identifiziert werden. Ihre Vollständigkeit wurde durch Immunodetektion ihrer N- und C-terminalen Affinitäts-*Tags* bestätigt (vgl. Abb. 17, Seite 59). Durch Optimierung der Reaktionstemperatur und vor allem durch Zusatz von Liposomen gelang es, die Ausbeute der zellfreien Translationsreaktion zu verbessern und die Lagerungsstabilität des Kanalproteins zu erhöhen (vgl. Abschnitt 3.4, Seite 64). Das Weizenkeimextrakt stellte somit ein geeignetes System zur zellfreien Produktion von K2P-Kanalprotein für die angestrebten elektrophysiologischen Charakterisierungen dar. Die Syntheseausbeuten um $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ Extrakt waren im Vergleich zu beispielsweise bakteriellen Kanälen wie KcsA immer noch klein (z. B. $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ Extrakt nach nur zwei Stunden Reaktionszeit in Quast et al. (2015a)). Die für weitere Reinigungsverfahren, Rekonstitutionen oder strukturelle Untersuchungen benötigten Proteinmengen würden eine starke Erhöhung des Reaktionsvolumens erfordern.

4.3 Insertion von zellfrei hergestellten K2P-Kanälen in Liposomen und Orientierung von *r*TREK1-Kanälen in der GUV-Membran

Zur Optimierung der Ausbeute an korrekt gefalteten K2P-Kanalprotein wurden der zellfreien Translationsreaktion verschiedene Liposomen zugesetzt, in die die synthetisierten Kanäle während der Reaktion eingelagert wurden. Die Insertion in die liposomale Membran konnte durch konfokale Aufnahmen der *r*TREK1-GFP-Fluoreszenz in der GUV-Membran belegt werden (vgl. Abb. 23, Seite 67). Zusätzlich konnten funktionelle *r*TREK1-Kanäle elektrophysiologisch nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 3.5, Abb. 27, Seite 70). Um die Lipidkonzentration in der Reaktion zu erhöhen und ein für die elektrophysiologischen Experimente im *Bilayer* günstigeres Lipid/Protein-Verhältnis zu erhalten, wurden SUV verwendet. Die Insertion von TREK2-GFP-Kanälen in SUV ließ sich anhand ihrer Fluoreszenz nach Isolierung der Proteoliposomen durch Dichtegradientenzentrifugation feststellen (vgl. Abschnitt 3.6.1, Abb. 28, Seite 72). Nach Fusion dieser Proteoliposomen mit künstlichen Membranen konnten die Kanäle außerdem elektrophysiologisch charakterisiert werden (vgl. Abschnitt 3.6.2 und Abschnitt 3.6.3, Seite 73 ff.).

Insertion in verschiedene Lipidumgebungen Die präformierten GUV und SUV bestanden aus unterschiedlichen Lipidarten. *r*TREK1- und *h*TREK2-Kanäle insertierten während der zellfreien Reaktion sowohl in die DPhPC-Membranen der GUV als auch

in die Asolectin-Membranen der SUV. DPhPC gehört zu den neutralen verzweigten Lipiden, welche in der Natur nur in bakteriellen Plasmamembranen vorkommen. Das pflanzliche Lipidextrakt Asolectin enthält neben Phosphatidylcholin und -ethanolamin auch Phosphatidylinositole, Phosphatidsäuren und andere Lipide. Viele Ionenkanäle wie KcsA, K_vAP oder MscL werden in Stabilität, Struktur und Funktion von der Lipidumgebung beeinflusst und erfordern beispielsweise die Anwesenheit negativ geladener Lipide (Poveda et al., 2014). Diese binden etwa in KcsA nicht nur an der Protein-Membrangrenze, sondern zwischen den Untereinheiten und vermitteln die Stabilität des Tetramers (Triano et al., 2010). Auch Bindungsstellen anderer Bestandteile zellulärer Membranen sind bekannt, z. B. Cholesterolbindungsstellen im C-Terminus von BK- und K_{ir}-Kanälen (Poveda et al., 2014). In Kristallstrukturen von K2P-Kanälen sind Acylketten an der membran zugewandten Außenseite vorhanden, jedoch nicht zwischen den Untereinheiten sichtbar (z. B. Brohawn et al. (2014); Dong et al. (2015)).

*h*TREK-Kanäle waren bei zellfreier Synthese prinzipiell nicht auf den Zusatz bestimmter Lipide für Faltung, den Zusammenhalt des Dimers und die Insertion in Liposomen angewiesen. Da funktionelle Kanäle in beiden Lipidumgebungen, besonders auch im unnatürlichen DPhPC, elektrophysiologisch nachgewiesen werden konnten, scheint eine bestimmte Lipidzusammensetzung bei den untersuchten TREK-Kanälen nicht Voraussetzung für die Kanalfunktion zu sein. Einschränkend muss auf die beschriebene Anwesenheit kleiner Mengen endogener Weizenkeimlipide in dem zellfreien Extrakt hingewiesen werden, so dass möglicherweise Lipide aus dieser Quelle am Kanal verblieben, sofern sie fest gebunden wurden.

Membraninsertion ohne zelluläre Translokationsmaschinerie Um die vorgestellten K2P-Kanäle in GUV und SUV zu erhalten, war der einfache Zusatz präformierter Liposomen in geeignetem Puffer zur zellfreien Reaktion ausreichend (vgl. Abschnitt 3.4.3, Seite 65). Dies ist auch für viele andere Membranproteine in verschiedenen zellfreien Systemen beschrieben (Sachse et al., 2014). Die Mechanismen der Insertion in Liposomen ohne Anwesenheit der zellulären Translokationsmaschinerie sind hingegen nicht aufgeklärt.

Für viele Membranproteine, unter anderem die bakteriellen Kanäle KcsA und MscL, wurde festgestellt, dass sie während einer zellfreien Synthese selbsttätig in reine Lipidvesikel insertieren können, obwohl sie bei ihrer Translation in der Zelle von den Insertasen SecYEG und YidC abhängen (van Dalen et al., 2002; Berrier et al., 2011). Erkenntnisse zur Dimerisierung und Translokation der K2P-Kanäle in der Zelle wurden bisher nicht publiziert. Für die Tetramerisierung, Oberflächenexpression und Funktion von *h*ERG-Kanälen sind beispielsweise Chaperone der DnaJ-Klasse notwendig (Li et al., 2017).

In eukaryotischen Zellen wird ein Ribosom, das ein entstehendes Membranprotein

mit α -Helices im Ausgangstunnel enthält, durch das Signalerkennungspartikel und seinen Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums schon kotranslational an das Translokon gebunden und die Insertion und Orientierung damit festgelegt (Pfeffer et al., 2016). Das Translokon enthält den TRAM-Komplex (*translocating chain-associated membrane protein*), der Membranproteine in Verbindung mit dem Sec61-Tunnel und verschiedenen Chaperonen in die ER-Membran inseriert.

Bei zellfreier Synthese müssten Liposomen die Membran des endoplasmatischen Retikulums ersetzen. Long et al. (2012) zeigten übereinstimmend damit, dass die zur Insertion angebotenen Liposomen kotranslational vorhanden sein müssen und direkt mit den Ribosomen assoziierten. Die Autoren vermuteten, dass sie den nacheinander aus dem Ausgangstunnel tretenden α -Helices eine schützende Umgebung bieten, die eine Entfaltung verhindert. Zellfreie Syntheseexperimente befeuern damit die Diskussion verschiedener Hypothesen zur Membranproteinfaltung (Harris et al., 2017). Sie sprechen für eine rein thermodynamisch getriebene Faltung in ein Minimum freier Energie und damit für eine Kodierung der Tertiärstruktur durch die Aminosäuresequenz („Anfinsen’s Prinzip“, Anfinsen (1973); Focke et al. (2016)). Dem gegenüber steht die Hypothese Translokon-abhängiger Membranproteininsertion (Cymer et al., 2015).

Die hier vorgestellte Synthese von TREK-Kanälen spricht für die Möglichkeit einer funktionellen Faltung von K2P-Kanälen ohne Hilfe einer zellulären Translokationsmaschinerie. Einschränkend muss bemerkt werden, dass die Anwesenheit mikrosomaler Strukturen in dem verwendeten kommerziellen Extrakt nicht geprüft wurde und nicht ausgeschlossen werden kann. Auch ist bekannt, dass das Weizenkeimextrakt Chaperone enthält, die mit Proteoliposomen assoziieren können (Goren und Fox, 2008).

Insertion mit präferentieller Orientierung Um festzustellen, in welcher Orientierung die synthetisierten Kanäle in die liposomale Membran inserieren, wurde ein Proteolyseexperiment durchgeführt. Das *r*TREK1-GFP-Fusionskonstrukt trug eine Proteaseerkennungssequenz (siehe Abschnitt 3.1, Abb. 8C, Seite 50) und wurde unter GUV-Zusatz zellfrei synthetisiert. Bei Inkubation der Proteo-GUV mit TEV-Protease konnte GFP nur freigesetzt werden, wenn der C-Terminus extraliposomal lag und die Schnittstelle zugänglich war. Etwa zwei Drittel der Kanäle zeigten eine Orientierung mit dem C-Terminus außerhalb des GUV (vgl. Abschnitt 3.4.4, Abb. 24, Seite 68).

Auch für andere in künstlichen Membranen untersuchte Kanäle wie den Modellkanal KcsA wurden solche präferentiellen Orientierungen gefunden (Yanagisawa et al., 2011). Berrier et al. (2013) beobachteten in *Patch-Clamp*-Messungen an rekonstituierten *m*TREK1-Proteoliposomen sogar eine einhundertprozentige Orientierung in 'outside-out' Richtung.

Drei Hypothesen zur Erklärung einer Membraninsertion mit präferentieller Orientie-

rung sind vorstellbar:

Zunächst könnte die Kegelform der K2P-Kanäle Einfluss auf die Orientierung nehmen, wenn sie in Membranen mit einer bestimmten Krümmung inserieren. Eine Krümmung erzeugt ein Druckprofil zwischen den Membranseiten, welches Inkorporation und Konformation von Membranproteinen beeinflussen kann (Marsh, 2007). Der an der inwärtigen Membranseite höhere laterale Druck könnte es der zur extrazellulären Kappe hin schmaleren Kanalpartie eher erlauben, in Richtung des Liposomeninnenraums zu inserieren. Der zum C-Terminus hin voluminösere Transmembranteil der K2P-Kanäle würde sich entsprechend eher in die auswärtigen Membranseite geringeren lateralen Drucks orientieren. Damit nähmen die Kanäle ohne Beteiligung von Insertasen oder Chaperonen eine Orientierung entsprechend des herrschenden Druckprofils in der Akzeptormembran ein. Die lateralen Drücke in den beiden Membranseiten wären um so größer, je höher die Krümmung ist, das heißt, in SUV viel höher als in GUV, planaren Membranen oder Zellen. Berrier et al. (2013) mutmaßten beispielsweise, dass die Asymmetrie vieler Ionenkanäle in Verbindung mit der Krümmung der von ihnen verwendeten SUV im Bereich von 100 nm bis 200 nm verantwortlich für die gerichtete Orientierung von MscL- und *mTREK1*-Kanälen sein könnte. Es stellt sich jedoch die Frage, inwieweit die Dimerisierung der Kanaluntereinheiten zum Zeitpunkt der Membraninsertion bereits erfolgt ist, denn die prominente Kegelform der K2P-Kanäle entsteht erst im dimeren Zustand. Weiterhin wurden für das Proteolyseexperiment und die ersten elektrophysiologischen Funktionsbestätigungen GUV mit Durchmessern im Bereich von gut einhundert bis mehreren hundert Mikrometern und dementsprechend geringer Krümmung verwendet. Bei dieser Größenordnung (d. h. größer als Zellen) ist es unwahrscheinlich, dass die lokale Krümmung auf das einzelne Kanalprotein wirkt. In SUV wurde die Orientierung nicht untersucht. Hier wäre es denkbar, dass die Form der K2P-Kanäle eine präferentielle Insertion entlang des Druckprofils begünstigt und möglicherweise damit auch zur beobachteten besseren Stabilität bei Lagerung beiträgt.

Als weitere Hypothese könnte eine Insertion durch hydrophobe Wechselwirkung der Transmembrandomänen mit dem Membrankern für eine präferentielle Orientierung in der beobachteten Richtung verantwortlich sein. Die Transmembranhelices der K2P-Kanäle könnten zunächst eine ungerichtete hydrophobe Wechselwirkung vermitteln. Die vergleichsweise kleine Kappenstruktur könnte den hydrophoben Membrankern im Gegensatz zum großen C-Terminus durchtreten und so zu der beobachteten eher extraliposomalen Lage des C-Terminus führen. Dieser Mechanismus impliziert jedoch, dass Faltung und Dimerisierung schon außerhalb der Lipidumgebung stattgefunden haben. Dies ist für Membranproteine im wässrigen Milieu unwahrscheinlich. Auch würde man in diesem Fall eine einhundertprozentige Orientierung mit dem C-Terminus nach außen erwarten.

Eine dritte Hypothese ist eine schon kotranslationale Assoziation und Insertion synthetisierter Membranhelices, die ebenfalls zur beobachteten Orientierung der zellfrei synthetisierten K2P-Kanäle führen könnte. Die von Long et al. (2012) nachgewiesene kotranslationale Assoziation von Ribosom mit wachsender Polypeptidkette und Liposomenmembran wurde schon angesprochen. Wenn die erste Transmembranhelix eines K2P-Kanals nach Verlassen des ribosomalen Ausgangstunnels unmittelbar mit dem N-Terminus voraus durch die liposomale Membran geführt würde, ergäbe sich aufgrund der Topologie der K2P-Kanäle aus vier Transmembranhelices mit intrazellulären Termini eine Orientierung mit dem C-Terminus ins Lumen des Liposoms. Die große zytoplasmatische Domäne müsste die Membran in diesem Fall komplett passieren, was energetisch nachteilig wäre.

Wenn der N-Terminus hingegen an der liposomalen Membranaußenseite im Bereich der Kopfgruppen verankert bleibt und die erste Helix sich durch die Membran faltet, wäre die Orientierung auch für alle folgenden festgelegt und der C-Terminus befände sich extraliposomal. Altrichter et al. (2017) beschrieben eine elektrostatische Interaktion zwischen Aminoterminus und Membranaußenseite als kritischen ersten Schritt der Membraninsertion eines KcsA-Monomers. Anschließend folgte die Translokation der hydrophoben Membranhelices. Drei positiv geladene Aminosäuren waren notwendig für diesen gerichteten Einbau von KcsA, eine höhere Zahl erhöhte die Insertionsrate. Die Verwendung von Liposomen aus neutralen Lipiden war möglich, die Insertionsrate verbesserte sich aber in Anwesenheit negativ geladener Lipide.

*r*TREK1 und *h*TREK2 enthalten beide neun positive Lysin- und Argininresiduen im N-terminalen Segment vor M1. Diese könnten wie in Altrichter et al. (2017) eine elektrostatische Verankerung des N-Terminus an den negativen Phosphatgruppen der liposomalen Membranlipide vermitteln. Anschließend könnten die folgenden Transmembranhelices direkt nach Austritt aus dem nach Long et al. (2012) mit dem Liposom assoziierten Ribosom sequenziell in den hydrophoben Membrankern insertieren. Dies würde erklären, weshalb der Carboxyterminus von TREK1-Protein bevorzugt außerhalb des GUV gefunden wurde. In Übereinstimmung damit erfolgt die Insertion des N-terminal trunkeierten TREK2_{Kristall}-Kanals in zufälliger Orientierung (Clausen et al., 2017). Interessanterweise enthält auch der Aminoterminus des von Long et al. (2012) untersuchten mitochondrialen ADP/ATP-Carriers mehrere positiv geladene Aminosäuren. Eine elektrostatische Interaktion dieser Reste mit der liposomalen Membran könnte die von den Autoren beobachtete Assoziation von Ribosom und Liposom hervorrufen. Da das zur Herstellung der GUV verwendete DPhPC ein neutrales zwitterionisches Lipid ist (vgl. Abb. 35B, Seite 95), könnte der Einsatz negativ geladener Lipide in weitergehenden Experimente sinnvoll sein, um die gerichtete Insertion zu verstärken.

4.4 Die fehlende N-Glykosylierung beeinträchtigt nicht die Herstellung funktioneller TREK-Kanäle

Bei heterologer Expression von K2P-Kanälen werden Glykosylierungen beobachtet (z. B. in Miller (2013) und Mant et al. (2013)). Nach der Elektrophorese von zellfrei hergestellten K2P-Kanälen wurden im Gel und nach Immunodetektion hingegen keine Banden beobachtet, die auf glykosylierte Kanäle hinwiesen (vgl. Abschnitt 3.3.3, Abb. 18, Seite 60). Die elektrophysiologischen Untersuchungen der Kanäle in GUV und in künstlichen Membranen zeigten, dass TREK-Kanäle ohne N-Glykosylierung funktionell sind. Eine Glykosylierung war also weder erforderlich für die korrekte Faltung, noch die Dimerisierung der Untereinheiten, noch die prinzipielle Funktion als Kaliumkanal. Dies deckt sich mit den funktionellen Untersuchungen von Kristallkonstrukten wie TWIK1 (Miller und Long, 2012) und TREK2 (Dong et al., 2015; Mant et al., 2013), deren Glykosylierungsstellen mutiert bzw. die Glykosylierung entfernt wurde und deren Funktion nachgewiesen wurde.

Für Na_V -, K_V - und *Shaker*-Kanäle wurde neben den *Trafficking*-Effekten in unterschiedlichem Ausmaß eine Verschiebung der Spannungsaktivierung hin zu depolarisierten Potenzialen beschrieben, bei letzteren vermutlich aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen von negativen Sialinsäuren der N-Glykosylierung mit dem elektrischen Feld des S4-Spannungssensors (Johnson und Bennett, 2008). K2P-Kanälen fehlt jedoch dieser Spannungssensor und die bisherigen Forschungen zur Glykosylierung enthalten keinen Hinweis auf die Modulation des *Gatings* durch die N-Glykosylierung in der M1-P1-Schleife.

Die Bedeutung der N-Glykosylierung könnte wie für einige K2P-Kanäle beispielsweise in Mant et al. (2013) und Bobak et al. (2017) beschrieben hauptsächlich im Transport durch ER und Golgi-Apparat zur Plasmamembran und retrograd (*Trafficking*) sowie in der Modulierung der Lebensdauer an der Membran liegen. Transportprozesse in ER und Golgi-Apparat können bei zellulärer Überexpression limitierend sein und zur Aggregation von Protein führen. Ihre Umgehung ist ein Vorteil der zellfreien Expression.

Die Rolle der Kappenstruktur, in der die Glykosylierungsstelle liegt, für das Schalten von K2P-Kanälen wurde noch nicht untersucht. Allerdings wurden in TREK1-Kanälen Aktivatorbindungsstellen für kleine chemische Verbindungen hinter den Porenhelices beschrieben, die die Beweglichkeit der Untereinheiten zueinander beeinflussen (Lolicato et al., 2017). Direkt zwischen den verschränkten Kappenhelices identifizierten Luo et al. (2017) eine Inhibitorbindungsstelle in TREK/TRAAK-Kanälen. Es ist vorstellbar, dass eine Glykosylierung die Zugänglichkeit solcher verdeckten Bindungstaschen, die Bewegung der Kappenhelices oder die allosterische Übermittlung zu einer Schaltstelle des Kanals beeinflussen könnte. Der direkte Vergleich von zellfrei hergestellten unglykosylierten Kanälen und solchen, die durch Mikrosomenzusatz Glykosylierungen

tragen, könnte hilfreich bei der Untersuchung solcher Effekte in einer künstlichen Membranumgebung sein.

4.5 Biophysikalische Eigenschaften von TREK-Kanälen

Eigenschaften von *r*TREK1-GFP-Kanälen Eine erste Funktionsbestätigung der zellfrei hergestellten Kanäle erfolgte durch *Patch-Clamp*-Messungen von *r*TREK1-GFP-Kanälen in GUV, die der Translationsreaktion zugesetzt worden waren (siehe Abschnitt 3.5, Seite 69). Die Kanäle hatten Einzelkanalamplituden von 4,9 pA bei +40 mV. Weiterhin konnten diese *r*TREK1-GFP-Kanäle in GUV mit planaren künstlichen Membranen fusioniert werden. Solche Messungen ergaben mittlere Amplituden von $-9,1$ pA bis 3,4 pA im Bereich von -80 mV bis +80 mV. Vergleichbare Werte für *r*TREK1-Wildtypkanäle wurden von Li et al. (2006) in Kardiomyozyten der Ratte gezeigt. Die zellfrei synthetisierten *r*TREK1-Kanäle waren folglich funktionell und entsprachen in ihren Grundeigenschaften den Wildtypkanälen.

Strom-Spannungs-Beziehung und Leitwert von TREK2-Kanälen Für die Messung von Einzelkanälen in *Bilayern* wurde der *h*TREK2-Kanal und sein GFP-Fusionsprotein gewählt. Die *h*TREK2-Kanäle haben unter den K2P-Kanälen den höchsten Einzelkanalleitwert, so dass die Einzelkanalamplituden von ~ 1 pA bis 8 pA gut detektierbar waren (vgl. Abschnitt 3.6.3, Seite 75). Es wurde ein Messsystem etabliert, in dem die Kanäle in einer vertikalen künstlichen Membran aus DPhPC elektrophysiologisch charakterisiert werden konnten (vgl. Abschnitt 2.5.4, Seite 43).

Der *h*TREK2-Kanal hatte bei +40 mV eine Einzelkanalamplitude von 2,75 pA und einen Leitwert von ~ 69 pS. *h*TREK2-GFP-Kanäle besaßen bei dieser Spannung eine Einzelkanalamplitude von 2,3 pA und einen Leitwert von ~ 54 pS. Die einwärts gleichrichtenden Strom-Spannungs-Kurven waren nahezu deckungsgleich. *h*TREK2-GFP-Kanäle unterschieden sich damit nicht von den unmarkierten Kanälen (vgl. Abb. 34B und Abb. 34A, Seite 80).

Die in künstlichen Membranen gemessenen Kanäle wiesen dieselben Merkmale wie heterolog exprimierte oder in nativen Zellen charakterisierte Wildtypkanäle auf: Einzelkanalamplituden, Leitwerte und der einwärtsgerichtete Verlauf der Strom-Spannungs-Beziehung von *h*TREK2- und *h*TREK2-GFP-Einzelkanälen stimmten mit den von Bang et al. (2000) publizierten Werten für die in COS 7-Zellen exprimierten Wildtypkanälen überein. Bei heterologer Expression in verschiedenen Zelltypen sowie in Spinalganglienneuronen wurden von Kang et al. (2007) die zwei Kanalphenotypen TREK2S und TREK2L mit verschiedenen Leitwerten beobachtet. Diese Phänotypen kommen nach Simkin et al. (2008) durch alternative Initiation zustande. Der am N-Terminus 55 Aminosäuren längere TREK2S-Kanal hat einen kleineren Leitwert als der kürzere TREK2L-

Kanal (verwendet wurde Isoform TREK-2a mit 538 Aminosäuren). Die in dieser Arbeit zellfrei synthetisierten Kanäle entsprachen der Isoform TREK-2b (543 Aminosäuren, 1–17 abweichend zu Isoform a) mit Initiation am ersten Startcodon, also langem N-Terminus. Übereinstimmend mit TREK2S-Kanälen zeigten sie die von Kang et al. (2007) beschriebenen Leitwerte und es wurden keine Kanäle mit höheren Leitwerten beobachtet. Auch die Strom-Spannungs-Beziehung der zellfrei hergestellten Kanäle deckte sich mit dem für TREK2S-Kanäle beschriebenen Verlauf. Als Beispiel aus nativen Zellen wurden TREK2-Kanäle mit demselben Verlauf der Strom-Spannungs-Beziehung von Han et al. (2003) in sekretorischen Neuronen des Hypothalamus (engl. *magnocellular neurosecretory cells* (MNCs)) der Ratte beschrieben.

Die zellfrei unter Liposomenzusatz hergestellten *h*TREK2- und *h*TREK2-GFP-Kanäle stimmten in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften mit denen beschriebener Wildtypkanäle überein. Die zellfreie Synthese produziert funktionsfähige Kanalproteine und eignet sich vermutlich zur Herstellung von weiteren K2P-Kanälen. Die Fusionswahrscheinlichkeit der Proteoliposomen mit künstlichen Membranen war jedoch in allen Messaufbauten, das heißt in Port-a-Patch, Orbit mini und vertikaler künstlicher Membran klein. Dies erschwert eine hohe Anzahl von Messungen und bedeutet einen hohen Zeitaufwand. Die Optimierung des Lipid/Protein-Verhältnisses und die Verwendung größerer Membranen (vertikale *Bilayer*) verbesserte die Insertionsrate zwar, zur Routineverwendung sollten jedoch weitere Optimierungsversuche unternommen werden. Die niedrige Fusionswahrscheinlichkeit ist ein verbreitetes Problem bei der Arbeit mit kleinen Proteinmengen, wie sie in der zellfreien Synthese humaner Kanalproteine vorliegen, und wurde von verschiedenen Gruppen unterschiedlich adressiert. Der *Shaker*-Kanal aus *Drosophila melanogaster* sowie *hK_{ir} 1.1*-Protein konnten von Jarecki et al. (2013) und Sackin et al. (2015) zellfrei hergestellt werden, die Funktion konnte jedoch nur nach Proteininjektion in *Xenopus*-Oocyten bestätigt werden. Meiner Kenntnis nach wurden bisher nur *hK_V 1.1*-Kanäle zellfrei synthetisiert und der Versuch einer elektrophysiologischen Untersuchung in einem künstlichen Membransystem unternommen (Renauld et al., 2017). Die Kanäle wurden jedoch zuvor rekonstituiert. Die Autoren versuchten die Insertion in ein emulsionsbasiertes Membransystem, sogenannte *droplet interface bilayer* (DIB), wechselten aufgrund der geringen Erfolgsrate jedoch zu einem fluoreszenzbasierten Test. Die Gründe für die geringen Insertionsraten wurden nicht aufgeklärt. Möglicherweise kann die Veränderung von Reaktionsbedingungen wie der Lipidzusammensetzung der angebotenen Liposomen, eine Reinigung mit Rekonstitution aus größeren Ansatzvolumina oder die Verwendung fusionsfördernder Peptide eine Verbesserung der Insertionsrate ermöglichen.

Offenwahrscheinlichkeit von TREK-Kanälen in DPhPC-Membranen Die Offenwahrscheinlichkeiten von r TREK1-GFP-Kanälen in planaren künstlichen Membranen und GUV sowie von h TREK2- und h TREK2-GFP-Kanälen in vertikalen Membranen waren ungewöhnlich hoch. Die Kanäle waren bei allen Spannungen sehr aktiv mit Offenwahrscheinlichkeiten von 0,5 oder höher. In Zellen liegt die Offenwahrscheinlichkeit von TREK-Kanälen im Ruhezustand unter 0,1 (Kang und Kim, 2006) und steigt bei Depolarisation der Membran oder bei Aktivierung an (Lotshaw, 2007). Bei TREK2 als auf Einzelkanalebene einwärts gleichrichtendem Kanal ist der Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit bei positiven Spannungen ausgeprägt und verursacht den makroskopisch leicht auswärtsrektifizierenden Strom (Bang et al., 2000). In den hier vorgestellten Messungen in vertikalen Membranen blieb die Offenwahrscheinlichkeit jedoch über den gesamten Spannungsbereich relativ konstant (siehe Abschnitt 3.6.3, Abb. 34C, Seite 80).

Von vielen Autoren wird als mögliche Ursache einer höheren Offenwahrscheinlichkeit außerhalb des Zellkontexts eine Mechanoaktivierung unterschiedlicher Genese genannt. Berrier et al. (2013) vermuteten, dass sich die Offenwahrscheinlichkeit von m TREK1-Kanälen in einem Membran*patch* eines Proteoliposoms möglicherweise durch die erzeugte Krümmung stark erhöht. Der TREK1-Kanal wird von Lauritzen et al. (2005) im kleinen *Patch* oder in künstlichen Membranen als stärker mechanosensitiv als in Zellen beschrieben, in denen das Cytoskelett die Mechanoaktivierung dämpft. Im Makro*patch* sei die Fläche des Membranflecks hingegen ausreichend groß, um keine stetige Aktivierung zu verursachen. Entsprechend kann lateraler Zug durch Krümmung für die sehr große Membranfläche des verwendeten *Bilayers* ausgeschlossen werden.

Ein durch Verschiebung der Membranschichten gegeneinander erzeugtes asymmetrisches Druckprofil soll h TREK2_{Kristall}-Kanäle aktivieren (Clausen et al., 2017). Eine solche Torsion ist im *Bilayer* nur an der Plateau-Gibbs-Grenze am Übergang von Lipiddoppelschicht zum Annulus aus ungeordnetem Lipid vorstellbar, an der auch spannungsinduziert Winkelverkleinerungen stattfinden (Hianik und Passechnik, 1995). Sollte eine Fusion mit SUV bevorzugt an dieser Grenze stattfinden und die Kanäle sich nur in diesem Membranbereich aufhalten, könnte dies eine Mechanoaktivierung erklären. Allerdings ist dies unwahrscheinlich, da anzunehmen ist, dass sich Kanäle lateral frei in der Lipiddoppelschicht bewegen. Auch erklärt es nicht die ebenfalls hohe Offenwahrscheinlichkeit im GUV.

Die Zusammensetzung der Membran selbst könnte Einfluss auf die Kanalfunktion nehmen. Laut Aryal et al. (2017) reichen Unterschiede in der Dicke des hydrophoben Membrankerns und der hydrophoben Transmembranbereiche (engl. *hydrophobic mismatch*) durch Lipidwahl und Lösungsmittelgehalt von künstlichen Membranen nicht, um Kanäle mechanisch zu aktivieren. Wie kann die beobachtete hohe Offenwahrscheinlichkeit von TREK-Kanälen also erklärt werden?

4.6 Mechanistische Implikationen für das Lipid-Schaltmodell

Seit langem ist bekannt, dass Lipide Struktur, Stabilität, Aufenthaltsort und Funktion von Membranproteinen beeinflussen können (Lee, 2011). Die Plasmamembran von Säugerzellen besteht neben Sphingolipiden hauptsächlich aus den Strukturlipiden Phosphatidylcholin ($\sim 50\%$), -ethanolamin, -serin, -inositol und Phosphatidsäuren (van Meer et al., 2008), die asymmetrisch in den beiden Membranseiten verteilt sind. Phosphatidylcholin und Sphingolipide befinden sich in erster Linie in der extrazellulären Membranhälfte, während Phosphatidylserin und -ethanolamin hauptsächlich in der inwendigen Membranseite auftreten. Die meisten Glycerolipide der Säugerzellmembran enthalten eine gesättigte und eine ungesättigte Acylketten mit einer Länge von 16–18 Kohlenstoffatomen. Die Membran enthält Mikrodomänen, die sich in Lipidzusammensetzung, Phasenzustand und Proteingehalt unterscheiden und die notwendigen Komponenten für spezifische zelluläre Funktionen wie Endozytose oder Signalwege rekrutieren (Madsen und Herlo, 2017). Krümmungen wie die tubulären endoplasmatischen Strukturen oder Vesikel werden meist durch Proteine vermittelt.

Im TWIK1_{Kristall}-Kanal, der ersten Kristallstruktur eines K2P-Kanals (Miller und Long, 2012), wurde Elektronendichte entsprechend einer Alkylkettenlänge von etwa elf Kohlenstoffatomen in den Fenestrierungen beobachtet. Nilius und Honoré (2012) postulierten daraufhin in Theorie einen interessanten Schaltmechanismus: Umliegende Membranlipide könnten in die Fenestrierungen eindringen und die Kaliumpermeation in der Pore beeinflussen. Brohawn et al. (2014) konnten die Anwesenheit von Alkylketten in der Pore bestätigen (Abb. 35A, links) und formulierten anhand der TRAAK_{Kristall}-Strukturen 4WFE–4WFH einen Schaltmechanismus, nach dem eine Mechanoaktivierung den Übergang in einen expandierten, leitfähigen *up*-Zustand bewirkt, in dem die Fenestrierungen schließen und damit blockierende Lipide aus dem Permeationsweg verdrängen.

Auch in TREK2_{Kristall} (Dong et al., 2015) befanden sich im *down*-Zustand nicht näher identifizierte Alkylketten in den Fenestrierungen (Abb. 35A, rechts). Es existieren somit viele kristallografische Hinweise darauf, dass Lipide bzw. deren Acylketten in den Fenestrierungen von K2P-Kanälen vorliegen können. In Abb. 35A sind die lösungsmittelzugänglichen Oberflächen von TRAAK_{Kristall}- und TREK2_{Kristall}-Strukturen mit den enthaltenen Acylketten dargestellt. Zusätzlich zu den strukturellen Untersuchungen wurde auch in Molekulardynamiksimulationen des TWIK1_{Kristall}-Kanals gefunden, dass Lipide von der inwendigen und auswärtigen Membranseite in die seitlichen Fenestrierungen eindringen können (Aryal et al., 2014).

Brohawn et al. (2014) zeigten in *Patch-Clamp*-Experimenten an Proteoliposomen, dass die Größe der makroskopischen TRAAK_{Kristall}-Ströme vom verwendeten Membranlipid abhing. Sie rekonstituierten TRAAK_{Kristall}-Kanäle einmal in einer Phospha-

tidylcholinmischung aus Ei und einmal in dem verzweigten Lipid DPhPC. Kanäle in DPhPC waren aktiver als jene in unverzweigten Phosphatidylcholinen. Brohawn et al. (2014) schlossen, dass das verzweigte Lipid nicht in die Fenestrierungen eindringen konnte, somit kein Lipidblock möglich war und der Kanal dadurch permanent geöffnet war.

Der von Brohawn et al. (2014) postulierte Lipidblock konnte bisher nicht bewiesen werden, insbesondere wurde die Offenwahrscheinlichkeit der Einzelkanäle nicht von Brohawn et al. (2014) bestimmt. Die Messungen dieser Arbeit betätigen nun die von den Autoren postulierte hohe Offenwahrscheinlichkeit der Einzelkanäle in DPhPC-Membranen. Molekulardynamiksimulationen von Aryal et al. (2015) ergaben, dass Acylketten mit einer Länge von 16 bis 18 Kohlenstoffatomen nicht weit genug in die Pore reichten, um die Kaliumpermeation zu blockieren. Die Autoren vermuteten, dass jedoch ein Einfluss auf die Bewegung der Transmembranhelices und den Zustand der Fenestrierungen in K2P-Kanälen möglich ist.

Neuere Erkenntnisse zum Schaltmechanismus von K2P-Kanälen sprechen ebenfalls gegen eine physische Blockierung der Kaliumpermeation durch Acylketten. Schewe et al. (2016) identifizierten den Selektivitätsfilter als primäre Schaltstelle in K2P-Kanälen. Der kritische Schritt zur Aktivierung der Kanäle ist die Bindung von Ionen an die S1–S4-Stellen im Selektivitätsfilter, nicht die eigentliche Permeation. Verändert man die Besetzung des Selektivitätsfilters entweder durch Wechsel der Ionenspezies oder durch Mutation, werden die Kanäle geöffnet. So zeigten Molekulardynamiksimulationen an TRAAK_{Kristall} (4I9W) mit Rubidium als permeierendem Ion, dass die Besetzung der S2-Stelle des Selektivitätsfilters zurückgeht. Ein Ionenwechsel von Kalium zu Rubidium erhöhte die Offenwahrscheinlichkeit in vielen K2P-Kanälen stark. Hier ist nicht nachvollziehbar, wie der Austausch eines Ions zur Verdrängung des blockierenden Lipids führen könnte.

Die Mutation des Threonins an der S4-Stelle (TRAAK T103C, entsprechend T172 in *hTREK2*-Kanälen) führte in den Simulationen zu einer starken Abnahme der Besetzung an S1 und S4. In den elektrophysiologischen Messungen zeigte sich dies durch die Überführung der Kanäle in lineare Leckkanäle. Die Threonin-Mutanten waren im Grundzustand voll geöffnet und auch durch weitere Stimuli wie Spannung, pH oder Arachidonsäure nicht zusätzlich aktivierbar. Wenn der nicht aktivierte Grundzustand nun dem *down*-Zustand entspricht und die Fenestrierungen für Acylketten zugänglich sind, würde man nach Brohawn et al. (2014) keinen Strom erwarten. Das Modell des Lipidblocks ist folglich nicht mit solchen Stimuli vereinbar, die keinen Schluss der Fenestrierung hervorrufen (McClenaghan et al., 2016), wie *gain-of-function*-Mutanten, intrazelluläre pH-Änderung oder Rubidium als permeierendes Ion. Molekulardynamiksimulationen weisen darauf hin, dass auch die Mechanoaktivierung über eine Besetzungsänderung im Selektivitätsfilter wirkt und ein Lipidblock nicht vorliegt (Aryal et al., 2017).

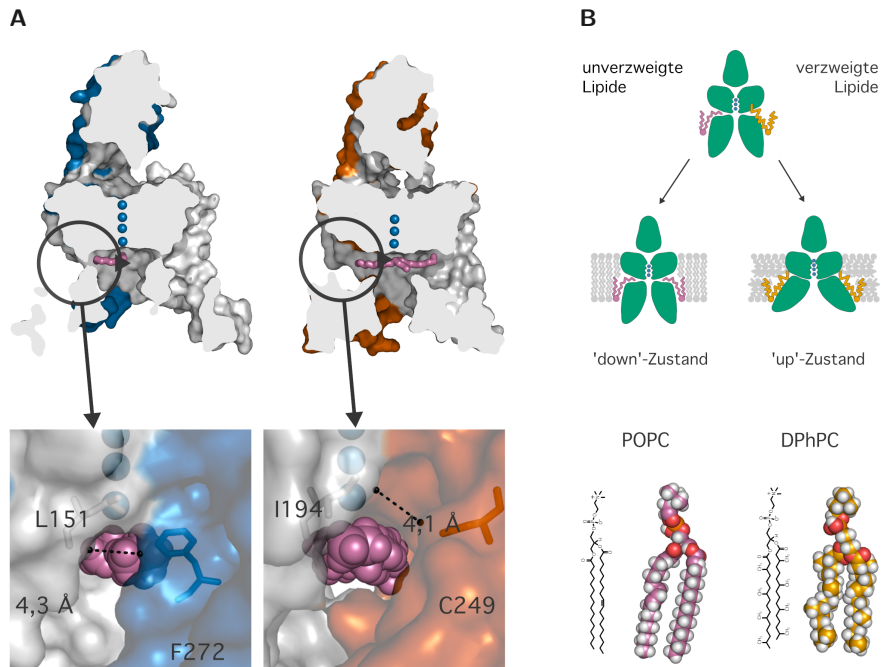


Abbildung 35: Acylketten in den Fenestrierungen von *h*TRAAK- und *h*TREK2-Kanälen und Modell zur Stabilisierung des *down*-Zustandes durch Anwesenheit von Membranlipiden in der Fenestrierung. **A** Die TRAAK_{Kristall}-Struktur (4WFF) und die TREK2_{Kristall}-Struktur (4XDJ) mit Schnittebenen senkrecht zur Membran zeigen die Lage der Fenestrierungen mit den kokristallisierten möglichen Acylketten (magenta). Im TRAAK_{Kristall}-Kanal liegt eine Acylkette auf der Seite, die sich im *down*-Zustand befindet (links oben). In der TREK2_{Kristall}-Struktur (4XDJ) im *down*-Zustand liegen Acylketten in beiden Fenestrierungen (rechts oben). Die Vergrößerungen in Aufsicht auf die membranseitigen Fenestrierungseingänge verdeutlichen die Weite zwischen den Helices (unten). Die mit etwa 4,3 Å engste Stelle in der TRAAK_{Kristall}-Struktur wird von L151 (M2 Kette A) und F272 (M4 Kette B) gebildet. Im TREK2_{Kristall}-Kanal ist der 4,1 Å enge Durchlass von I194 (M2 Kette A) und C249 (M3 Kette B) begrenzt, die Acylkette liegt etwas darunter. Die Abstände wurden in PyMOL in der Conolly-Oberflächendarstellung mit einem Ballradius von 1,4 Å gemessen. Sie können in der Realität abweichen und sollen zur Verdeutlichung der Größenordnung dienen. **B** Modell der Stabilisierung des *down*-Zustands durch Membranlipide. In der Säugermembran vorkommende unverzweigte Lipide wie 1-Palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholin (POPC) (16:0-18:1 PC, Van-der-Waals-Struktur unten links) können mit ihren schlankeren Acylketten in die Fenestrierungen eindringen und den *down*-Zustand stabilisieren. Verzweigte Lipide wie das in künstlichen Membranen verwendete DPhPC mit raumgreiferen Acylketten (4ME 16:0 PC, Van-der-Waals-Struktur unten rechts) können nicht oder nur erschwert binden und erlauben eher den Übergang in den aktiveren *up*-Zustand.

Hingegen ist vorstellbar, dass die in den Fenestrierungen liegenden Acylketten den *down*-Zustand stabilisieren, ohne die Permeation direkt zu blockieren. Hohle Strukturen wie die Fenestrierungen können im hydrophoben Membrankern nicht mit Wasser gefüllt sein. Ein Verschluss der Fenestrierungen durch Transmembranhelices wäre energetisch günstiger und würde den Kanal eher in den *up*-Zustand überführen (Aryal et al., 2017). Füllen jedoch Acylketten umliegender Membranlipide die Fenestrierungen, kann der Kanal im *down*-Zustand bestehen. Verzweigte Lipide wie DPhPC könnten nicht oder weniger gut in die Fenestrierungen eindringen, so dass der *down*-Zustand destabilisiert und der Übergang in den aktiveren *up*-Zustand mit einer höheren Offenwahrscheinlichkeit erleichtert wäre (siehe Schema in Abb. 35B). Auch Dong et al. (2015) zogen eine Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit von TREK2-Kanälen im *up*-Zustand in Betracht. In Übereinstimmung mit diesem Vorschlag zeigten die in DPhPC-GUV oder künstlichen DPhPC-Membranen charakterisierten Kanäle eine sehr hohe Offenwahrscheinlichkeit bei allen gemessenen Spannungen.

Das verwendete DPhPC (4ME 16:0 PC, Abb. 35B) trägt 4 Methylgruppen je Acylkette und wird aufgrund seiner Stabilität gegenüber Oxidation und Elektroporation (Polak et al., 2013) sowie der geringen Temperaturabhängigkeit (Kučerka et al., 2011; Zhuang et al., 2014) häufig in biophysikalischen Experimenten an Modellmembranen verwendet. Die Dicke des hydrophoben Membrankerns ist etwas geringer (Zhuang et al., 2014) und durch die Verzweigung hat DPhPC die größte Fläche pro Lipid unter den gängigen Phospholipiden für Modellmembranen (Tristram-Nagle et al., 2010). Entsprechend nehmen die Acylketten im Vergleich zu gleichlangen unverzweigten Lipiden ein höheres Volumen ein. Sie sind ebenso ungeordnet wie die Ketten ungesättigter Lipide (Zhuang et al., 2014).

Abb. 35A verdeutlicht die Größenverhältnisse. Die Fenestrierungen sind vergrößert gezeigt und die engsten Durchgänge auf Höhe der Acylketten bemessen. Mit einer Weite von etwas mehr als 4 Å könnte eine Acylkette z. B. von POPC möglicherweise gerade hindurchtreten (vgl. Van-der Waals-Struktur in Abb. 35B). Die voluminösere DPhPC-Kette hätte an dieser Stelle keinen oder nur erschwerten Zugang zur Fenestrierung (Brohawn et al., 2014). Aus diesen Betrachtungen ergibt sich ein einfaches zukünftiges Experiment: Bei einer Wiederholung der vorgestellten Messungen von TREK-Kanälen in einer Membran aus unverzweigtem Lipid sollte folglich eine niedrige Offenwahrscheinlichkeit feststellbar sein, da Acylketten in die Fenestrierung eindringen und den *down*-Zustand stabilisieren könnten. Weiterhin könnte durch die schrittweise Erhöhung des unverzweigten Lipidanteils und die Verfolgung der Änderung der Offenwahrscheinlichkeit die apparente Affinität der Fenestrierung für einzelne Lipide bestimmt werden.

Die Stabilisierung des inaktiven Zustands durch Membranlipide wurde von Pliotas et al. (2015) für den prokaryotischen mechanosensitiven Kanal MscS postuliert. MscS

besitzt wie K2P-Kanäle membranseitige Taschen, die im Grundzustand von mehreren dicht gepackten Membranlipiden besetzt sind. Wird diese Interaktion gestört, wird der geschlossene Zustand destabilisiert und der Kanal aktiviert. Dies geschieht bei lateralem Zug, der Phospholipide aus der Tasche zieht. Durch die Bewegung von Transmembranhelices wird das Volumen dieser Taschen kleiner und der Kanal geht in den offenen Zustand über. Es bewegen sich also erst Lipide, welche nicht fest gebunden sind, und das Kanalprotein folgt in den jeweils stabilen Zustand.

Kürzlich wurde die Besetzung membranseitig zugänglicher Proteintaschen mit Lipiden auch als möglicher Mechanismus für den noch wenig erforschte TMEM63-Kanal OSCA1.2 in Betracht gezogen (Jojoa-Cruz et al., 2018). Diese dimeren Kanäle sind stark abhängig von der Interaktion mit Membranlipiden, die die Monomere zusammenhalten, und besitzen eine vor dem cytoplasmatischen Ausgang zur Membran hin offene Pore, in die in Molekulardynamiksimulationen Lipide eindringen. Möglicherweise stellt die Lipid-Stabilisierung eines geschlossenen Zustands also einen übergreifenden Mechanismus für viele mechanosensitive Kanalfamilien mit unterschiedlichen Strukturen dar.

4.7 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnten zellfrei hergestellte K2P-Kanäle in künstlichen Membranen elektrophysiologisch charakterisiert werden. Im Weizenkeimextrakt gelang die Synthese verschiedener vollständiger K2P-Kanäle sowie der GFP-Fusionsproteine. Mit Hilfe von TREK2-GFP-Kanälen wurde das Tabakzellextrakt als nichtkommerzielle Alternative mit etwa 50% der Ausbeute des Weizenkeimextrakts etabliert. Die Kanäle konnten durch Zusatz verschiedener präformierter Liposomen während der Synthese direkt in definierte Lipidmembranen inseriert werden. Ihre GFP-Fusionsproteine waren durch fluoreszenzoptische Methoden in der liposomalen Membran nachweisbar. Die GFP-Fusionsproteine verhielten sich wie die unmarkierten Kanäle und zeigten dieselben biophysikalischen Eigenschaften. Sie wurden bei der Optimierung der Reaktionsbedingungen eingesetzt und stellen geeignete Faltungsindikatoren für K2P-Kanäle dar. Mit ihrer Hilfe wurde eine präferentielle Orientierung der Kanäle in den Liposomen mit nach außen weisenden C-Termini festgestellt, die einen kotranslationalen Insertionsmechanismus implizierte. Der funktionelle Nachweis von *r*TREK1-Kanälen gelang in GUV und planaren künstlichen Membranen. Das Lipid/Protein-Verhältnis für eine erfolgreiche Fusion mit vertikalen künstlichen Membranen wurde für *h*TREK2- und *h*TREK2-GFP-Kanäle durch Insertion in SUV und Reinigung der Proteoliposomen optimiert. Die Kanäle konnten dadurch elektrophysiologisch charakterisiert werden und zeigten Leitwerte und Strom-Spannungs-Beziehungen, die mit den publizierten Eigenschaften der Wildtypkanäle in nativen Membranen übereinstimmten. Die Beobachtung einer hohen Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle in DPhPC-Membranen führte zur Mo-

difikation des Lipid-Schaltmodells nach Brohawn et al. (2014). Es wird vorgeschlagen, dass in den Fenestrierungen liegende Acylketten den inaktiveren *down*-Zustand von K2P-Kanälen stabilisieren, ohne die Permeation von Kaliumionen zu blockieren, und dass dies dem Grundzustand der Kanäle in der Zelle entspricht.

Der in dieser Arbeit vorgestellte Ansatz bedeutet eine Reduktion von Komplexität: Zuerst wird der unglykosylierte Kanal ohne assoziierte zelluläre Faktoren in einer stabilisierenden liposomalen Umgebung zellfrei synthetisiert. Dann wird er in eine definierte künstlichen Membran inseriert, welche eine elektrophysiologische Charakterisierung erlaubt. Die hier demonstrierte Anwendung auf TREK-Kanäle stellt die erste Charakterisierung eines zellfrei synthetisierten und vollständigen humanen Kanals in einer vertikalen künstlichen Membran dar. Meine Ergebnisse zeigen, dass Membranlipide möglicherweise an der Stabilisierung des *down*-Zustandes von K2P-Kanälen in der Zelle beteiligt sind.

Die Aufklärung prinzipieller Funktionsweisen erfordert oft ein vereinfachtes Modellsystem, um sich Aspekten der Fragestellung ohne ablenkende Faktoren nähern zu können. Untersuchungen zu Mechanosensitivität, Mechanismus der Lipidregulation oder Einfluss von Partnerproteinen auf die biophysikalischen Eigenschaften sind stark vereinfacht, wenn Druck, Lipidumgebung des Kanals oder vorhandene Bindungspartner besser kontrolliert und manipuliert werden können.

Die gängige Liposomenherstellung durch die Hydratation von Lipidfilmen oder Elektroformation führt wie auch die Formierung von künstlichen Membranen durch Verstreichen von Lipiden in Lösungsmittel zu symmetrischen Membranen mit gleicher Verteilung der Lipidspezies zwischen beiden Membranseiten. Die Nachbildung von asymmetrischen Lipidverteilungen zwischen den Membranseiten ist in Liposomen mit Emulsionsverfahren (z. B. Pautot et al. (2003)) jedoch machbar. Asymmetrische *Bilayer* können nach der Montal-Müller-Methode formiert werden (Montal und Mueller, 1972). Es ist damit möglich, auch Membranzusammensetzungen intrazellulärer Organellen zu imitieren, die einer elektrophysiologischen Untersuchung nur schwer zugänglich sind.

Viele Fragestellungen der Lipidinteraktion konnten für andere Kanalüberfamilien wie die K_v -Kanäle bereits adressiert werden (Moreno et al., 2016), sind jedoch für K2P-Kanäle bisher unbeantwortet. Insbesondere Mechanismen der Lipidregulation wie beispielsweise die Aktivierung von TREK-Kanälen durch Arachidonsäure und PIP_2 könnten besonders gut in solchen Membranen untersucht werden. So wurde von Patel et al. (1998) für die amphiphile, kegelförmige Arachidonsäure postuliert, dass sie von der negativ geladenen inwendigen Membranseite abgestoßen bevorzugt in die auswärtige Membranseite inseriert. Dies verursacht eine Expansion der auswärtigen Membranseite und damit eine Krümmung, die mechanosensitive Kanäle wie die TREK-Kanäle aktiviert. Auch könnte die Affinität von Phospholipiden wie PIP_2 für K2P-Kanäle bestimmt

werden, wie dies beispielsweise für K_{ir} -Kanäle und verschiedene Phosphatidylinositole beschrieben wurde (Fürst et al., 2014).

Die vorgestellte Kombination von zellfreier Expression und *Bilayer*-Messungen ist ein aussichtsreiches Verfahren, zukünftig auch Information über wenig charakterisierte Vertreter der K2P-Kanäle zu erhalten. TWIK2 und TWIK3 mit den bemerkenswerten Abweichungen ihrer Selektivitätsfiltersequenz (Chavez et al., 1999; Pountney et al., 1999), solche mit möglicherweise ausschließlich intrazellulärer Lokalisation wie TWIK2, die ihre Erforschung in zellbasierten Systemen mit elektrophysiologische Methoden sehr schwierig machen (Bobak et al., 2017), sowie TASK5, über dessen funktionelle Eigenschaften weiterhin nichts bekannt ist (Ashmole et al., 2001; Kim und Gnatenco, 2001), wären äußerst interessante Ziele.

Im Sinne industrieller Nutzung nachwachsender Rohstoffe wird die zellfreie Bioproduktion im Rahmen des Strategieprozesses „Biotechnologie2020+“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung wissenschaftspolitisch gefördert. Die Verwendung pflanzlicher Extrakte zur Proteinsynthese ist im Kontext der Nachhaltigkeit tierischen Expressionssystemen überlegen und kann Tierversuche oder die Notwendigkeit tierischer Komponenten wie z.B. fötalem Kälberserum in passenden Bereichen der Forschung und Produktion reduzieren. Die zellfreie Synthese eignet sich auch zur Anwendung in Hochdurchsatzverfahren, wenn ein einfaches Ausleseverfahren wie Flussversuche in Liposomen angewendet werden kann (Su et al., 2016). Der Nachweis, dass funktionelle humane K2P-Kanäle zellfrei herstellbar sind, könnte die Grundlage einer Entwicklung von Routinetestverfahren für die pathophysiologisch interessanten K2P-Kanäle etwa in der Arzneistoffprüfung bilden.

Literatur

- Afonina, Z. A., Myasnikov, A. G., Shirokov, V. A., Klaholz, B. P., und Spirin, A. S. Formation of circular polyribosomes on eukaryotic mRNA without cap-structure and poly(A)-tail: a cryo electron tomography study. *Nucleic Acids Research* 42(14):9461–9 2014. doi: 10.1093/nar/gku599.
- Altrichter, S., Haase, M., Loh, B., Kuhn, A., und Leptihn, S. Mechanism of the Spontaneous and Directional Membrane Insertion of a 2-Transmembrane Ion Channel. *ACS Chemical Biology* 12(2):380–388 2017. doi: 10.1021/acscchembio.6b01085.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., und Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403–410 1990.
- Anfinsen, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181(4096):223–30 1973. doi: 10.1126/science.181.4096.223.
- Angenendt, P., Nyarsik, L., Szaflarski, W., Glökler, J., Nierhaus, K. H., Lehrach, H., Cahill, D. J., und Lueking, A. Cell-Free Protein Expression and Functional Assay in Nanowell Chip Format. *Analytical Chemistry* 76(7):1844–1849 2004. doi: 10.1021/ac035114i.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I., und Stockinger, H. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research* 40:W597–W603 2012.
- Aryal, P., Abd-Wahab, F., Bucci, G., Sansom, M. S. P., und Tucker, S. J. A hydrophobic barrier deep within the inner pore of the TWIK-1 K2P potassium channel. *Nature Communications* 5(1):1–9 2014. doi: 10.1038/ncomms5377.
- Aryal, P., Abd-Wahab, F., Bucci, G., Sansom, M. S. P., und Tucker, S. J. Influence of lipids on the hydrophobic barrier within the pore of the TWIK-1 K2P channel. *Channels* 9(1):44–9 2015. doi: 10.4161/19336950.2014.981987.
- Aryal, P., Jarerattanachat, V., Clausen, M. V., Schewe, M., McClenaghan, C., Argent, L., Conrad, L. J., Dong, Y. Y., Pike, A. C. W., Carpenter, E. P., Baukrowitz, T., Sansom, M. S. P., und Tucker, S. J. Bilayer-Mediated Structural Transitions Control Mechanosensitivity of the TREK-2 K2P Channel. *Structure* 25(5):708–718.e2 2017. doi: 10.1016/j.str.2017.03.006.
- Ashmole, I., Goodwin, P., und Stanfield, P. TASK-5, a novel member of the tandem pore K + channel family. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 442(6):828–833 2001. doi: 10.1007/s004240100620.
- Bagriantsev, S. N., Peyronnet, R., Clark, K. A., Honoré, E., und Minor, D. L. Multiple modalities converge on a common gate to control K2P channel function. *The EMBO Journal* 30(17):3594–606 2011. doi: 10.1038/emboj.2011.230.
- Bagriantsev, S. N., Clark, K. A., und Minor, D. L. Metabolic and thermal stimuli control K(2P)2.1 (TREK-1) through modular sensory and gating domains. *The EMBO Journal* 31(15):3297–308 2012. doi: 10.1038/emboj.2012.171.
- Bang, H., Kim, Y., und Kim, D. TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K+ channel family. *The Journal of Biological Chemistry* 275(23):17412–9 2000. doi: 10.1074/jbc.M000445200.

- Bayliss, D. A., Barhanin, J., Gestreau, C., und Guyenet, P. G. The role of pH-sensitive TASK channels in central respiratory chemoreception. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 467(5):917–29 2015. doi: 10.1007/s00424-014-1633-9.
- Beebe, E. T., Makino, S.-I., Nozawa, A., Matsubara, Y., Frederick, R. O., Primm, J. G., Goren, M. A., und Fox, B. G. Robotic large-scale application of wheat cell-free translation to structural studies including membrane proteins. *New Biotechnology* 28(3):239–249 2011. doi: 10.1016/j.nbt.2010.07.003.
- Beltrán, L. R., Beltrán, M., Aguado, A., Gisselmann, G., und Hatt, H. 2-Aminoethoxydiphenyl borate activates the mechanically gated human KCNK channels KCNK 2 (TREK-1), KCNK 4 (TRAAK), and KCNK 10 (TREK-2). *Frontiers in Pharmacology* 4:63 2013. doi: 10.3389/fphar.2013.00063.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., und Sayers, E. W. GenBank. *Nucleic Acids Research* 45(D1):D37–D42 2017. doi: 10.1093/nar/gkw1070.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., und Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 28:235–242 2000.
- Berrier, C., Guilvout, I., Bayan, N., Park, K.-H., Mesneau, A., Chami, M., Pugsley, A. P., und Ghazi, A. Coupled cell-free synthesis and lipid vesicle insertion of a functional oligomeric channel MscL MscL does not need the insertase YidC for insertion in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808(1):41–6 2011. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.09.018.
- Berrier, C., Pozza, A., de Lacroix de Lavalette, A., Chardonnet, S., Mesneau, A., Jaxel, C., le Maire, M., und Ghazi, A. The purified mechanosensitive channel TREK-1 is directly sensitive to membrane tension. *The Journal of Biological Chemistry* 288(38):27307–14 2013. doi: 10.1074/jbc.M113.478321.
- Bista, P., Cerina, M., Ehling, P., Leist, M., Pape, H.-C., Meuth, S. G., und Budde, T. The role of two-pore-domain background K(+) (K2P) channels in the thalamus. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 467(5):895–905 2014. doi: 10.1007/s00424-014-1632-x.
- Bittner, S., Ruck, T., Schuhmann, M. K., Herrmann, A. M., ou Maati, H. M., Bobak, N., Göbel, K., Langhauser, F., Stegner, D., Ehling, P., Borsotto, M., Pape, H.-C., Nieswandt, B., Kleinschnitz, C., Heurteaux, C., Galla, H.-J., Budde, T., Wiendl, H., und Meuth, S. G. Endothelial TWIK-related potassium channel-1 (TREK1) regulates immune-cell trafficking into the CNS. *Nature Medicine* 19(9):1161–1165 2013. doi: 10.1038/nm.3303.
- Blin, S., Ben Soussia, I., Kim, E.-J., Brau, F., Kang, D., Lesage, F., und Bichet, D. Mixing and matching TREK/TRAAK subunits generate heterodimeric K2P channels with unique properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(15):4200–5 2016. doi: 10.1073/pnas.1522748113.
- Bobak, N., Feliciangeli, S., Chen, C.-C., Ben Soussia, I., Bittner, S., Pagnotta, S., Ruck, T., Biel, M., Wahl-Schott, C., Grimm, C., Meuth, S. G., und Lesage, F. Recombinant tandem of pore-domains in a Weakly Inward rectifying K+ channel 2 (TWIK2) forms active lysosomal channels. *Scientific Reports* 7(1):649 2017. doi: 10.1038/s41598-017-00640-8.
- Bockenbauer, D., Zilberberg, N., und Goldstein, S. A. KCNK2: reversible conversion of a hippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel. *Nature Neuroscience* 4(5):486–91 2001. doi: 10.1038/87434.

- Borsook, H., Deasy, C. L., Haagensmit, A. J., Keighley, G., und Lowy, P. H. Incorporation in vitro of labeled amino acids into proteins of rabbit reticulocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 196(2):669–94 1952.
- Braun, C. J., Lachnit, C., Becker, P., Henkes, L. M., Arrigoni, C., Kast, S. M., Moroni, A., Thiel, G., und Schroeder, I. Viral potassium channels as a robust model system for studies of membrane-protein interaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838(4):1096–1103 2014. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.06.010.
- Braun, G., Lengyel, M., Enyedi, P., und Czirják, G. Differential sensitivity of TREK-1, TREK-2 and TRAAK background potassium channels to the polycationic dye ruthenium red. *British Journal of Pharmacology* 172(7):1728–1738 2015. doi: 10.1111/bph.13019.
- Brohawn, S. G., del Marmol, J., und MacKinnon, R. Crystal Structure of the Human K2P TRAAK, a Lipid- and Mechano-Sensitive K⁺ Ion Channel. *Science* 335(6067):436–441 2012. doi: 10.1126/science.1213808.
- Brohawn, S. G., Campbell, E. B., und MacKinnon, R. Domain-swapped chain connectivity and gated membrane access in a Fab-mediated crystal of the human TRAAK K⁺ channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(6): 2129–34 2013. doi: 10.1073/pnas.1218950110.
- Brohawn, S. G., Campbell, E. B., und MacKinnon, R. Physical mechanism for gating and mechanosensitivity of the human TRAAK K⁺ channel. *Nature* 516(7529):126–30 2014. doi: 10.1038/nature14013.
- Buntru, M., Vogel, S., Spiegel, H., und Schillberg, S. Tobacco BY-2 cell-free lysate: an alternative and highly-productive plant-based in vitro translation system. *BMC Biotechnology* 14(1):37 2014. doi: 10.1186/1472-6750-14-37.
- Buntru, M., Vogel, S., Stoff, K., Spiegel, H., und Schillberg, S. A versatile coupled cell-free transcription-translation system based on tobacco BY-2 cell lysates. *Biotechnology and Bioengineering* 112(5):867–878 2015. doi: 10.1002/bit.25502.
- Carlson, E. D., Gan, R., Hodgman, C. E., und Jewett, M. C. Cell-free protein synthesis: Applications come of age. *Biotechnology Advances* 30(5):1185–1194 2012. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.016.
- Chavez, R. A., Gray, A. T., Zhao, B. B., Kindler, C. H., Mazurek, M. J., Mehta, Y., Forsayeth, J. R., und Yost, C. S. TWIK-2, a New Weak Inward Rectifying Member of the Tandem Pore Domain Potassium Channel Family. *The Journal of Biological Chemistry* 274(12):7887–7892 1999. doi: 10.1074/jbc.274.12.7887.
- Chemin, J., Patel, A. J., Duprat, F., Lauritzen, I., Lazdunski, M., und Honoré, E. A phospholipid sensor controls mechanogating of the K⁺ channel TREK-1. *The EMBO Journal* 24(1): 44–53 2005a. doi: 10.1038/sj.emboj.7600494.
- Chemin, J., Patel, A. J., Duprat, F., Zanzouri, M., Lazdunski, M., und Honoré, E. Lysophosphatidic acid-operated K⁺ channels. *The Journal of Biological Chemistry* 280(6):4415–21 2005b. doi: 10.1074/jbc.M408246200.
- Chojnacki, S., Cowley, A., Lee, J., Foix, A., und Lopez, R. Programmatic access to bioinformatics tools from EMBL-EBI update: 2017. *Nucleic Acids Research* 45(W1):W550–W553 2017. doi: 10.1093/nar/gkx273.

- Clausen, M. V., Jarerattanachat, V., Carpenter, E. P., Sansom, M. S. P., und Tucker, S. J. Asymmetric mechanosensitivity in a eukaryotic ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(40):E8343–E8351 2017. doi: 10.1073/pnas.1708990114.
- Colquhoun, D. und Sigworth, F. J. Fitting and Statistical Analysis of Single-Channel Records. In: Sakmann, B. und Neher, E., (Hrsg.), *Single-Channel Recording* Kapitel 19, Seiten 483–587. Springer US Boston, MA 2 Ausgabe 1995. doi: 10.1007/978-1-4615-7858-1_11.
- Comoglio, Y., Levitz, J., Kienzler, M. A., Lesage, F., Isacoff, E. Y., und Sandoz, G. Phospholipase D2 specifically regulates TREK potassium channels via direct interaction and local production of phosphatidic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(37):13547–52 2014. doi: 10.1073/pnas.1407160111.
- Cymer, F., von Heijne, G., und White, S. H. Mechanisms of Integral Membrane Protein Insertion and Folding. *Journal of Molecular Biology* 427(5):999–1022 2015. doi: 10.1016/j.jmb.2014.09.014.
- Decher, N., Kiper, A. K., Rolfes, C., Schulze-Bahr, E., und Rinné, S. The role of acid-sensitive two-pore domain potassium channels in cardiac electrophysiology: focus on arrhythmias. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 467(5):1055–67 2015. doi: 10.1007/s00424-014-1637-5.
- Deutsch, C. The birth of a channel. *Neuron* 40(2):265–76 2003.
- Devaraneni, P. K., Devereaux, J. J., und Valiyaveetil, F. I. In vitro folding of KvAP, a voltage-gated K⁺ channel. *Biochemistry* 50(48):10442–50 2011. doi: 10.1021/bi2012965.
- Di, A., Xiong, S., Ye, Z., Malireddi, R. K. S., Kometani, S., Zhong, M., Mittal, M., Hong, Z., Kanneganti, T.-D., Rehman, J., und Malik, A. B. The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation. *Immunity* 49(1):56–65.e4 2018. doi: 10.1016/j.immuni.2018.04.032.
- Dong, Y. Y., Pike, A. C. W., Mackenzie, A., McClenaghan, C., Aryal, P., Dong, L., Quigley, A., Grieben, M., Goubin, S., Mukhopadhyay, S., Ruda, G. F., Clausen, M. V., Cao, L., Brennan, P. E., Burgess-Brown, N. A., Sansom, M. S. P., Tucker, S. J., und Carpenter, E. P. K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science* 347(6227):1256–1259 2015. doi: 10.1126/science.1261512.
- Doyle, D. A. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science* 280(5360):69–77 1998. doi: 10.1126/science.280.5360.69.
- Dumont, J. N. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology* 136(2):153–179 1972. doi: 10.1002/jmor.1051360203.
- Egenberger, B., Polleichtner, G., Wischmeyer, E., und Döring, F. N-linked glycosylation determines cell surface expression of two-pore-domain K⁺ channel TRESK. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391(2):1262–7 2010. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.12.056.
- Enyedi, P. und Czirják, G. Properties, regulation, pharmacology, and functions of the K2P channel, TRESK. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 467(5):945–958 2015. doi: 10.1007/s00424-014-1634-8.
- Erickson, A. H. und Blobel, G. Cell-free translation of messenger RNA in a wheat germ system. In: *Methods in Enzymology* Band 96 Seiten 38–50. Academic Press 1983.

- Etlinger, J. D. und Goldberg, A. L. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(1):54–8 1977.
- Feliciangeli, S., Chatelain, F. C., Bichet, D., und Lesage, F. The family of K²P channels: salient structural and functional properties. *The Journal of Physiology* 593(12):2587–2603 2015. doi: 10.1113/jphysiol.2014.287268.
- Focke, P. J., Hein, C., Hoffmann, B., Matulef, K., Bernhard, F., Dötsch, V., und Valiyaveetil, F. I. Combining in Vitro Folding with Cell Free Protein Synthesis for Membrane Protein Expression. *Biochemistry* 55(30):4212–4219 2016. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00488.
- Franks, N. P. und Honoré, E. The TREK K²P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection. *Trends in Pharmacological Sciences* 25(11):601–8 2004. doi: 10.1016/j.tips.2004.09.003.
- Fürst, O., Mondou, B., und D’Avanzo, N. Phosphoinositide regulation of inward rectifier potassium (Kir) channels. *Frontiers in Physiology* 4:1–8 2014. doi: 10.3389/fphys.2013.00404.
- Gan, R. und Jewett, M. C. A combined cell-free transcription-translation system from *Saccharomyces cerevisiae* for rapid and robust protein synthe. *Biotechnology Journal* 9(5):641–51 2014. doi: 10.1002/biot.201300545.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., und Bairoch, A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* 31(13):3784–8 2003.
- Geertsma, E. R., Groeneveld, M., Slotboom, D.-J., und Poolman, B. Quality control of overexpressed membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(15):5722–7 2008. doi: 10.1073/pnas.0802190105.
- Gengenbach, B., Müschen, C., und Buyel, J. Expression and purification of human phosphatase and actin regulator 1 (PHACTR1) in plant-based systems. *Protein Expression and Purification* 151:46–55 2018. doi: 10.1016/j.pep.2018.06.003.
- Goldstein, M., Rinné, S., Kiper, A. K., Ramírez, D., Netter, M. F., Bustos, D., Ortiz-Bonnin, B., González, W., und Decher, N. Functional mutagenesis screens reveal the ‘cap structure’ formation in disulfide-bridge free TASK channels. *Scientific Reports* 6:19492 2016. doi: 10.1038/srep19492.
- González, W., Valdebenito, B., Caballero, J., Riadi, G., Riedelsberger, J., Martínez, G., Ramírez, D., Zúñiga, L., Sepúlveda, F. V., Dreyer, I., Janta, M., und Becker, D. K²P channels in plants and animals. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 467(5):1091–1104 2015. doi: 10.1007/s00424-014-1638-4.
- Goren, M. A. und Fox, B. G. Wheat germ cell-free translation, purification, and assembly of a functional human stearyl-CoA desaturase complex. *Protein Expression and Purification* 62(2):171–178 2008. doi: 10.1016/j.pep.2008.08.002.
- Han, J., Gnatenco, C., Sladek, C. D., und Kim, D. Background and tandem-pore potassium channels in magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. *The Journal of Physiology* 546(Pt 3):625–39 2003.
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., und Hutchison, G. R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics* 4(1):17 2012. doi: 10.1186/1758-2946-4-17.

- Harris, N. J., Reading, E., Ataka, K., Grzegorzewski, L., Charalambous, K., Liu, X., Schlesinger, R., Heberle, J., und Booth, P. J. Structure formation during translocon-unassisted co-translational membrane protein folding. *Scientific Reports* 7(1):8021 2017. doi: 10.1038/s41598-017-08522-9.
- Henrich, E., Hein, C., Dötsch, V., und Bernhard, F. Membrane protein production in Escherichia coli cell-free lysates. *FEBS Letters* 589(15):1713–1722 2015. doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.045.
- Hianik, T. und Paschechnik, V. I. *Bilayer Lipid Membranes. Structure and Mechanical Properties*. Kluwer Academic Publishers Springer Netherlands 1995.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., und Kurachi, Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological Reviews* 90(1):291–366 2010. doi: 10.1152/physrev.00021.2009.
- Honoré, E. The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nature reviews. Neuroscience* 8(4):251–61 2007. doi: 10.1038/nrn2117.
- Honoré, E., Maingret, F., Lazdunski, M., und Patel, A. J. An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K⁺ channel TREK-1. *The EMBO Journal* 21(12):2968–2976 2002. doi: 10.1093/emboj/cdf288.
- Hughes, S., Foster, R. G., Peirson, S. N., und Hankins, M. W. Expression and localisation of two-pore domain (K2P) background leak potassium ion channels in the mouse retina. *Scientific Reports* 7(1):46085 2017. doi: 10.1038/srep46085.
- Hwang, E. M., Kim, E., Yarishkin, O., Woo, D. H., Han, K.-S., Park, N., Bae, Y., Woo, J., Kim, D., Park, M., Lee, C. J., und Park, J.-Y. A disulphide-linked heterodimer of TWIK-1 and TREK-1 mediates passive conductance in astrocytes. *Nature Communications* 5:3227 2014. doi: 10.1038/ncomms4227.
- Inoue, H., Nojima, H., und Okayama, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* 96(1):23–28 1990. doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-P.
- Jarecki, B. W., Makino, S.-i., Beebe, E. T., Fox, B. G., und Chanda, B. Function of Shaker potassium channels produced by cell-free translation upon injection into Xenopus oocytes. *Scientific Reports* 3:1040 2013. doi: 10.1038/srep01040.
- Jo, A., Hoi, H., Zhou, H., Gupta, M., und Montemagno, C. D. Single-molecule study of full-length NaChBac by planar lipid bilayer recording. *PLOS ONE* 12(11):e0188861 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0188861.
- Johnson, D. und Bennett, E. S. Gating of the shaker potassium channel is modulated differentially by N-glycosylation and sialic acids. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 456(2):393–405 2008. doi: 10.1007/s00424-007-0378-0.
- Jojoa-Cruz, S., Saotome, K., Murthy, S. E., Tsui, C. C. A., Sansom, M. S., Patapoutian, A., und Ward, A. B. Cryo-EM structure of the mechanically activated ion channel OSCA1.2. *eLife* 7:e41845 2018. doi: 10.7554/eLife.41845.
- Junge, F., Haberstock, S., Roos, C., Stefer, S., Proverbio, D., Dötsch, V., und Bernhard, F. Advances in cell-free protein synthesis for the functional and structural analysis of membrane proteins. *New Biotechnology* 28(3):262–271 2011. doi: 10.1016/j.nbt.2010.07.002.

- Kamura, N., Sawasaki, T., Kasahara, Y., Takai, K., und Endo, Y. Selection of 5'-untranslated sequences that enhance initiation of translation in a cell-free protein synthesis system from wheat embryos. *Bioorganic & Medicinal Chemistry letters* 15(24):5402–6 2005. doi: 10.1016/j.bmcl.2005.09.013.
- Kang, D. und Kim, D. TREK-2 (K2P10.1) and TRESK (K2P18.1) are major background K⁺ channels in dorsal root ganglion neurons. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 291(1):C138–46 2006. doi: 10.1152/ajpcell.00629.2005.
- Kang, D., Choe, C., Cavanaugh, E., und Kim, D. Properties of single two-pore domain TREK-2 channels expressed in mammalian cells. *The Journal of Physiology* 583(Pt 1):57–69 2007. doi: 10.1113/jphysiol.2007.136150.
- Kim, D. und Gnatenco, C. TASK-5, a New Member of the Tandem-Pore K⁺ Channel Family. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284(4):923–930 2001. doi: 10.1006/bbrc.2001.5064.
- Kim, H., Botelho, S. C., Park, K., und Kim, H. Use of carbonate extraction in analyzing moderately hydrophobic transmembrane proteins in the mitochondrial inner membrane. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 24(12):2063–9 2015. doi: 10.1002/pro.2817.
- Kim, S., Lee, Y., Tak, H.-M., Park, H.-J., Sohn, Y.-S., Hwang, S., Han, J., Kang, D., und Lee, K. W. Identification of blocker binding site in mouse TRESK by molecular modeling and mutational studies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1828(3):1131–42 2013. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.11.021.
- Kim, Y., Bang, H., Gnatenco, C., und Kim, D. Synergistic interaction and the role of C-terminus in the activation of TRAAK K⁺ channels by pressure, free fatty acids and alkali. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 442(1):64–72 2001. doi: 10.1007/s004240000496.
- Klammt, C., Schwarz, D., Fendler, K., Haase, W., Dötsch, V., und Bernhard, F. Evaluation of detergents for the soluble expression of α -helical and β -barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *FEBS Journal* 272(23):6024–6038 2005. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.05002.x.
- Komoda, K., Naito, S., und Ishikawa, M. Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated plant protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(7):1863–1867 2004. doi: 10.1073/pnas.0307131101.
- Kopec, W., Köpfer, D. A., Vickery, O. N., Bondarenko, A. S., Jansen, T. L. C., de Groot, B. L., und Zachariae, U. Direct knock-on of desolvated ions governs strict ion selectivity in K⁺ channels. *Nature Chemistry* 10(8):813–820 2018. doi: 10.1038/s41557-018-0105-9.
- Köpfer, D. A., Song, C., Gruene, T., Sheldrick, G. M., Zachariae, U., und de Groot, B. L. Ion permeation in K channels occurs by direct Coulomb knock-on. *Science* 346(6207):352–5 2014. doi: 10.1126/science.1254840.
- Kozak, M. Context Effects and Inefficient Initiation at Non-AUG Codons in Eucaryotic Cell-Free Translation Systems. *Molecular and Cellular Biology* 9(11):5073–5080 1989.
- Kuang, Q., Purhonen, P., und Hebert, H. Structure of potassium channels. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72(19):3677–3693 2015. doi: 10.1007/s00018-015-1948-5.
- Kučerka, N., Nieh, M.-P., und Katsaras, J. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808(11):2761–2771 2011. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.07.022.

- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685 1970.
- Lauritzen, I., Chemin, J., Honoré, E., Jodar, M., Guy, N., Lazdunski, M., and Patel, A. J. Cross-talk between the mechano-gated K2P channel TREK-1 and the actin cytoskeleton. *EMBO Reports* 6(7):642–8 2005. doi: 10.1038/sj.embor.7400449.
- Lee, A. G. Biological membranes: the importance of molecular detail. *Trends in Biochemical Sciences* 36(9):493–500 2011. doi: 10.1016/j.tibs.2011.06.007.
- Lengyel, M., Czirják, G., and Enyedi, P. Formation of Functional Heterodimers by TREK-1 and TREK-2 Two-pore Domain Potassium Channel Subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 291(26):13649–61 2016. doi: 10.1074/jbc.M116.719039.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *The EMBO Journal* 15(5):1004–11 1996a.
- Lesage, F., Reyes, R., Fink, M., Duprat, F., Guillemare, E., and Lazdunski, M. Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *The EMBO Journal* 15(23):6400–7 1996b.
- Lesage, F., Terrenoire, C., Romey, G., and Lazdunski, M. Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 275(37):28398–405 2000. doi: 10.1074/jbc.M002822200.
- Levitz, J., Royal, P., Comoglio, Y., Wdziekonski, B., Schaub, S., Clemens, D. M., Isacoff, E. Y., and Sandoz, G. Heterodimerization within the TREK channel subfamily produces a diverse family of highly regulated potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(15):4194–4199 2016. doi: 10.1073/pnas.1522459113.
- Li, K., Jiang, Q., Bai, X., Yang, Y.-F., Ruan, M.-Y., and Cai, S.-Q. Tetrameric Assembly of K⁺ Channels Requires ER-Located Chaperone Proteins. *Molecular Cell* 65(1):52–65 2017. doi: 10.1016/j.molcel.2016.10.027.
- Li, M., Jan, Y., and Jan, L. Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* 257(5074):1225–1230 1992. doi: 10.1126/science.1519059.
- Li, X. T., Dyachenko, V., Zuzarte, M., Putzke, C., Preisig-Müller, R., Isenberg, G., and Daut, J. The stretch-activated potassium channel TREK-1 in rat cardiac ventricular muscle. *Cardiovascular Research* 69(1):86–97 2006. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.08.018.
- Liu, D. V., Zawada, J. F., and Swartz, J. R. Streamlining Escherichia Coli S30 Extract Preparation for Economical Cell-Free Protein Synthesis. *Biotechnology Progress* 21(2):460–465 2005. doi: 10.1021/bp049789y.
- Lolicato, M., Riegelhaupt, P. M., Arrigoni, C., Clark, K. A., and Minor, D. L. Transmembrane Helix Straightening and Buckling Underlies Activation of Mechanosensitive and Thermosensitive K2P Channels. *Neuron* 84(6):1198–212 2014. doi: 10.1016/j.neuron.2014.11.017.
- Lolicato, M., Arrigoni, C., Mori, T., Sekioka, Y., Bryant, C., Clark, K. A., and Minor, D. L. K2P2.1 (TREK-1)-activator complexes reveal a cryptic selectivity filter binding site. *Nature* 547(7663):364–368 2017. doi: 10.1038/nature22988.

- Long, A. R., O'Brien, C. C., und Alder, N. N. The Cell-Free Integration of a Polytopic Mitochondrial Membrane Protein into Liposomes Occurs Cotranslationally and in a Lipid-Dependent Manner. *PLOS ONE* 7(9):e46332 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0046332.
- Lopes, C. M. B., Rohács, T., Czirják, G., Balla, T., Enyedi, P., und Logothetis, D. E. PIP2 hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K⁺ channels. *The Journal of Physiology* 564(Pt 1):117–29 2005. doi: 10.1113/jphysiol.2004.081935.
- Lotshaw, D. P. Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K⁺ channels. *Cell Biochemistry and Biophysics* 47(2): 209–256 2007. doi: 10.1007/s12013-007-0007-8.
- Luo, Q., Chen, L., Cheng, X., Ma, Y., Li, X., Zhang, B., Li, L., Zhang, S., Guo, F., Li, Y., und Yang, H. An allosteric ligand-binding site in the extracellular cap of K2P channels. *Nature Communications* 8(1):378 2017. doi: 10.1038/s41467-017-00499-3.
- Lyukmanova, E. N., Shenkarev, Z. O., Khabibullina, N. F., Kopeina, G. S., Shulepko, M. A., Paramonov, A. S., Mineev, K. S., Tikhonov, R. V., Shingarova, L. N., Petrovskaya, L. E., Dolgikh, D. A., Arseniev, A. S., und Kirpichnikov, M. P. Lipid-protein nanodiscs for cell-free production of integral membrane proteins in a soluble and folded state: comparison with detergent micelles, bicelles and liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1818(3): 349–58 2012. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.10.020.
- Ma, R., Seifi, M., Papanikolaou, M., Brown, J. F., Swinny, J. D., und Lewis, A. TREK-1 Channel Expression in Smooth Muscle as a Target for Regulating Murine Intestinal Contractility: Therapeutic Implications for Motility Disorders. *Frontiers in Physiology* 9:157 2018. doi: 10.3389/fphys.2018.00157.
- Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T., und Endo, Y. A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: Plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(2):559–564 2000.
- Madin, K., Sawasaki, T., Kamura, N., Takai, K., Ogasawara, T., Yazaki, K., Takei, T., Miura, K.-I., und Endo, Y. Formation of circular polyribosomes in wheat germ cell-free protein synthesis system. *FEBS Letters* 562(1-3):155–9 2004. doi: 10.1016/S0014-5793(04)00221-2.
- Madsen, K. und Herlo, R. Recursive Alterations of the Relationship between Simple Membrane Geometry and Insertion of Amphiphilic Motifs. *Membranes* 7(1):6 2017. doi: 10.3390/membranes7010006.
- Maingret, F. Lysophospholipids Open the Two-pore Domain Mechano-gated K⁺ Channels TREK-1 and TRAAK. *The Journal of Biological Chemistry* 275(14):10128–10133 2000. doi: 10.1074/jbc.275.14.10128.
- Maingret, F., Fosset, M., Lesage, F., Lazdunski, M., und Honoré, E. TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K⁺ channel. *The Journal of Biological Chemistry* 274(3):1381–7 1999a.
- Maingret, F., Patel, A. J., Lesage, F., Lazdunski, M., und Honoré, E. Mechano- or Acid Stimulation, Two Interactive Modes of Activation of the TREK-1 Potassium Channel. *The Journal of Biological Chemistry* 274(38):26691–26696 1999b. doi: 10.1074/jbc.274.38.26691.

- Mant, A., Williams, S., Roncoroni, L., Lowry, E., Johnson, D., and O’Kelly, I. N-glycosylation-dependent control of functional expression of background potassium channels K2P3.1 and K2P9.1. *The Journal of Biological Chemistry* 288(5):3251–64 2013. doi: 10.1074/jbc.M112.405167.
- Marsh, D. Lateral Pressure Profile, Spontaneous Curvature Frustration, and the Incorporation and Conformation of Proteins in Membranes. *Biophysical Journal* 93(11):3884–3899 2007. doi: 10.1529/biophysj.107.107938.
- Mathews, M. B., Osborn, M., and Lingrel, J. B. Translation of Globin Messenger RNA in a Heterologous Cell-free System. *Nature New Biology* 233(41):206–209 1971. doi: 10.1038/newbio233206a0.
- Mathie, A., Al-Moubarak, E., and Veale, E. L. Gating of two pore domain potassium channels. *The Journal of Physiology* 588(Pt 17):3149–56 2010. doi: 10.1113/jphysiol.2010.192344.
- Mazella, J., Pétrault, O., Lucas, G., Deval, E., Béraud-Dufour, S., Gandin, C., El-Yacoubi, M., Widmann, C., Guyon, A., Chevet, E., Taouji, S., Conductier, G., Corinus, A., Coppola, T., Gobbi, G., Nahon, J.-L., Heurteaux, C., and Borsotto, M. Spadin, a sortilin-derived peptide, targeting rodent TREK-1 channels: a new concept in the antidepressant drug design. *PLOS Biology* 8(4):e1000355 2010. doi: 10.1371/journal.pbio.1000355.
- McClenaghan, C., Schewe, M., Aryal, P., Carpenter, E. P., Baukrowitz, T., and Tucker, S. J. Polymodal activation of the TREK-2 K2P channel produces structurally distinct open states. *The Journal of General Physiology* 147(6):497–505 2016. doi: 10.1085/jgp.201611601.
- Miller, A. N. *Structural and Biochemical Studies of the Human Two Pore Domain Potassium Channel K2P1*. Dissertation Graduate School of Biomedical Sciences, Sloan-Kettering Cancer Center New York 2013.
- Miller, A. N. und Long, S. B. Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel K2P1. *Science* 335(6067):432–6 2012. doi: 10.1126/science.1213274.
- Molina, M. L., Fernández-Ballester, G., Barrera, F. N., Riquelme, G., Encinar, J. A., und González-Ros, J. Influence of C-Terminal Protein Domains and Protein-Lipid Interactions on Tetramerization and Stability of the Potassium Channel KcsA. *Biochemistry* 43(47):14924–14931 2004. doi: 10.1021/bi048889+.
- Montal, M. und Mueller, P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69(12):3561–6 1972.
- Moreno, C., de la Cruz, A., und Valenzuela, C. In-Depth Study of the Interaction, Sensitivity, and Gating Modulation by PUFAs on K⁺ Channels; Interaction and New Targets. *Frontiers in Physiology* 7:578 2016. doi: 10.3389/fphys.2016.00578.
- Müller-Lucks, A., Bock, S., Wu, B., und Beitz, E. Fluorescent in situ folding control for rapid optimization of cell-free membrane protein synthesis. *PLOS ONE* 7(7):e42186 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0042186.
- Murbartián, J., Lei, Q., Sando, J. J., und Bayliss, D. A. Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. *The Journal of Biological Chemistry* 280(34):30175–84 2005. doi: 10.1074/jbc.M503862200.
- Navarro, S., Borchman, D., und Bicknell-Brown, E. Lipid-protein ratios by infrared spectroscopy. *Analytical Biochemistry* 136(2):382–389 1984. doi: 10.1016/0003-2697(84)90233-1.

- Niemeyer, M. I., Cid, L. P., Valenzuela, X., Paeile, V., und Sepúlveda, F. V. Extracellular conserved cysteine forms an intersubunit disulphide bridge in the KCNK5 (TASK-2) K⁺ channel without having an essential effect upon activity. *Molecular Membrane Biology* 20(2):185–191 2003. doi: 10.1080/0968768031000084181.
- Niles, W., Levis, R., und Cohen, F. Planar bilayer membranes made from phospholipid monolayers form by a thinning process. *Biophysical Journal* 53(3):327–335 1988. doi: 10.1016/S0006-3495(88)83110-2.
- Nilius, B. und Honoré, E. Sensing pressure with ion channels. *Trends in Neurosciences* 35(8):477–86 2012. doi: 10.1016/j.tins.2012.04.002.
- Nishimura, K., Matsuura, T., Nishimura, K., Sunami, T., Suzuki, H., und Yomo, T. Cell-Free Protein Synthesis inside Giant Unilamellar Vesicles Analyzed by Flow Cytometry. *Langmuir* 28(22):8426–8432 2012. doi: 10.1021/la3001703.
- Nozawa, A., Nanamiya, H., Miyata, T., Linka, N., Endo, Y., Weber, A. P. M., und Tozawa, Y. A cell-free translation and proteoliposome reconstitution system for functional analysis of plant solute transporters. *Plant & Cell physiology* 48(12):1815–20 2007. doi: 10.1093/pcp/pcm150.
- Nozawa, A., Ogasawara, T., Matsunaga, S., Iwasaki, T., Sawasaki, T., und Endo, Y. Production and partial purification of membrane proteins using a liposome-supplemented wheat cell-free translation system. *BMC Biotechnology* 11(1):35 2011. doi: 10.1186/1472-6750-11-35.
- O’Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., und Hutchison, G. R. Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics* 3(1):33 2011. doi: 10.1186/1758-2946-3-33.
- Ogawa, A., Doi, Y., und Matsushita, N. Improvement of in vitro-transcribed amber suppressor tRNAs toward higher suppression efficiency in wheat germ extract. *Organic & Biomolecular Chemistry* 9(24):8495–503 2011. doi: 10.1039/c1ob06351k.
- Patel, A. J. und Honoré, E. Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends in Neurosciences* 24(6):339–346 2001. doi: 10.1016/S0166-2236(00)01810-5.
- Patel, A. J., Honoré, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F., und Lazdunski, M. A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *The EMBO Journal* 17(15):4283–90 1998. doi: 10.1093/emboj/17.15.4283.
- Patel, A. J., Lazdunski, M., und Honoré, E. Lipid and mechano-gated 2P domain K⁺ channels. *Current Opinion in Cell Biology* 13(4):422–428 2001. doi: 10.1016/S0955-0674(00)00231-3.
- Pautot, S., Frisken, B. J., und Weitz, D. A. Engineering asymmetric vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(19):10718–21 2003. doi: 10.1073/pnas.1931005100.
- Perozo, E., Kloda, A., Cortes, D. M., und Martinac, B. Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating. *Nature Structural Biology* 9(9):696–703 2002. doi: 10.1038/nsb827.
- Pfeffer, S., Dudek, J., Zimmermann, R., und Förster, F. Organization of the native ribosome-translocon complex at the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1860(10):2122–2129 2016. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.06.024.

- Piechotta, P. L., Rapedius, M., Stansfeld, P. J., Bollepalli, M. K., Ehrlich, G., Andres-Enguix, I., Fritzenschaft, H., Decher, N., Sansom, M. S. P., Tucker, S. J., und Baukrowitz, T. The pore structure and gating mechanism of K2P channels. *The EMBO Journal* 30(17):3607–19 2011. doi: 10.1038/emboj.2011.268.
- Plant, L. D., Rajan, S., und Goldstein, S. A. N. K2P channels and their protein partners. *Current Opinion in Neurobiology* 15(3):326–33 2005. doi: 10.1016/j.conb.2005.05.008.
- Pliotas, C., Dahl, A. C. E., Rasmussen, T., Mahendran, K. R., Smith, T. K., Marius, P., Gault, J., Banda, T., Rasmussen, A., Miller, S., Robinson, C. V., Bayley, H., Sansom, M. S. P., Booth, I. R., und Naismith, J. H. The role of lipids in mechanosensation. *Nature Structural & Molecular Biology* 22(12):991–998 2015. doi: 10.1038/nsmb.3120.
- Polak, A., Bonhenry, D., Dehez, F., Kramar, P., Miklavčič, D., und Tarek, M. On the Electroporation Thresholds of Lipid Bilayers: Molecular Dynamics Simulation Investigations. *The Journal of Membrane Biology* 246(11):843–850 2013. doi: 10.1007/s00232-013-9570-7.
- Pountney, D. J., Gulkarov, I., Vega-Saenz de Miera, E., Holmes, D., Saganich, M., Rudy, B., Artman, M., und Coetzee, W. A. Identification and cloning of TWIK-originated similarity sequence (TOSS): a novel human 2-pore K⁺ channel principal subunit. *FEBS Letters* 450(3):191–6 1999. doi: 10.1016/S0014-5793(99)00495-0.
- Poveda, J., Giudici, A., Renart, M., Molina, M., Montoya, E., Fernández-Carvajal, A., Fernández-Ballester, G., Encinar, J., und González-Ros, J. Lipid modulation of ion channels through specific binding sites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838(6):1560–1567 2014. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.10.023.
- Quast, R. B., Claussnitzer, I., Merk, H., Kubick, S., und Gerrits, M. Synthesis and site-directed fluorescence labeling of azido proteins using eukaryotic cell-free orthogonal translation systems. *Analytical Biochemistry* 451:4–9 2014. doi: 10.1016/j.ab.2014.01.013.
- Quast, R. B., Kortt, O., Henkel, J., Dondapati, S. K., Wüstenhagen, D. A., Stech, M., und Kubick, S. Automated production of functional membrane proteins using eukaryotic cell-free translation systems. *Journal of Biotechnology* 203:45–53 2015a. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.03.015.
- Quast, R. B., Mrusek, D., Hoffmeister, C., Sonnabend, A., und Kubick, S. Cotranslational incorporation of non-standard amino acids using cell-free protein synthesis. *FEBS Letters* 589(15):1703–12 2015b. doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.041.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., und Deber, C. M. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(6):1760–5 2009. doi: 10.1073/pnas.0813167106.
- Renauld, S., Cortes, S., Bersch, B., Henry, X., De Waard, M., und Schaack, B. Functional reconstitution of cell-free synthesized purified Kv channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1859(12):2373–2380 2017. doi: 10.1016/j.bbamem.2017.09.002.
- Renigunta, V., Schlichthörl, G., und Daut, J. Much more than a leak: structure and function of K2P-channels. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 467(5):867–894 2015. doi: 10.1007/s00424-015-1703-7.
- Rigaud, J.-L., Pitard, B., und Levy, D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1231(3):223–246 1995. doi: 10.1016/0005-2728(95)00091-V.

- Roberts, B. E. und Paterson, B. M. Efficient Translation of Tobacco Mosaic Virus RNA and Rabbit Globin 9S RNA in a Cell-Free System from Commercial Wheat Germ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70:2330–2334 1973.
- Ryoo, K. und Park, J.-Y. Two-pore Domain Potassium Channels in Astrocytes. *Experimental Neurobiology* 25(5):222–232 2016. doi: 10.5607/en.2016.25.5.222.
- Sachse, R., Wüstenhagen, D., Šamaličková, M., Gerrits, M., Bier, F. F., und Kubick, S. Synthesis of membrane proteins in eukaryotic cell-free systems. *Engineering in Life Sciences* 13(1): 39–48 2013. doi: 10.1002/elsc.201100235.
- Sachse, R., Dondapati, S. K., Fenz, S. F., Schmidt, T., und Kubick, S. Membrane protein synthesis in cell-free systems: From bio-mimetic systems to bio-membranes. *FEBS Letters* 588(17):2774–2781 2014. doi: 10.1016/j.febslet.2014.06.007.
- Sackin, H., Nanazashvili, M., und Makino, S.-i. Direct injection of cell-free Kir1.1 protein into *Xenopus* oocytes replicates single-channel currents derived from Kir1.1 mRNA. *Channels* 9(4):196–9 2015. doi: 10.1080/19336950.2015.1063752.
- Sakamaki, K., Ishii, T. M., Sakata, T., Takemoto, K., Takagi, C., Takeuchi, A., Morishita, R., Takahashi, H., Nozawa, A., Shinoda, H., Chiba, K., Sugimoto, H., Saito, A., Tamate, S., Satou, Y., Jung, S.-K., Matsuoka, S., Koyamada, K., Sawasaki, T., Nagai, T., und Ueno, N. Dysregulation of a potassium channel, THIK-1, targeted by caspase-8 accelerates cell shrinkage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863(11):2766–2783 2016. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.08.010.
- Sandoz, G., Thümmler, S., Duprat, F., Feliciangeli, S., Vinh, J., Escoubas, P., Guy, N., Lazdunski, M., und Lesage, F. AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K(+) channels into open leak channels. *The EMBO Journal* 25(24): 5864–72 2006. doi: 10.1038/sj.emboj.7601437.
- Sandoz, G., Tardy, M. P., Thümmler, S., Feliciangeli, S., Lazdunski, M., und Lesage, F. Mtap2 is a constituent of the protein network that regulates twik-related K⁺ channel expression and trafficking. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28(34):8545–52 2008. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1962-08.2008.
- Sandoz, G., Douguet, D., Chatelain, F. C., Lazdunski, M., und Lesage, F. Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(34):14628–33 2009. doi: 10.1073/pnas.0906267106.
- Sandoz, G., Bell, S. C., und Isacoff, E. Y. Optical probing of a dynamic membrane interaction that regulates the TREK1 channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(6):2605–10 2011. doi: 10.1073/pnas.1015788108.
- Sawasaki, T., Hasegawa, Y., Morishita, R., Seki, M., Shinozaki, K., und Endo, Y. Genome-scale, biochemical annotation method based on the wheat germ cell-free protein synthesis system. *Phytochemistry* 65(11):1549–1555 2004. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.04.023.
- Schewe, M., Nematian-Ardestani, E., Sun, H., Musinszki, M., Cordeiro, S., Bucci, G., de Groot, B. L., Tucker, S. J., Rapedius, M., und Baukrowitz, T. A Non-canonical Voltage-Sensing Mechanism Controls Gating in K2P K(+) Channels. *Cell* 164(5):937–49 2016. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.002.

- Schewe, M., Sun, H., Mert, Ü., Mackenzie, A., Pike, A. C. W., Schulz, F., Constantin, C., Vowinkel, K. S., Conrad, L. J., Kiper, A. K., González, W., Musinszki, M., Tegtmeyer, M., Pryde, D. C., Belabed, H., Nazare, M., de Groot, B. L., Decher, N., Fakler, B., Carpenter, E. P., Tucker, S. J., und Baukrowitz, T. A pharmacological master key mechanism that unlocks the selectivity filter gate in K⁺ channels. *Science* 363(6429):875–880 2019. doi: 10.1126/science.aav0569.
- Schrodinger LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 2015.
- Schwappach, B. An overview of trafficking and assembly of neurotransmitter receptors and ion channels (Review). *Molecular Membrane Biology* 25(4):270–278 2008. doi: 10.1080/09687680801960998.
- Schwarz, D., Junge, F., Durst, F., Frölich, N., Schneider, B., Reckel, S., Sobhanifar, S., Dötsch, V., und Bernhard, F. Preparative scale expression of membrane proteins in Escherichia coli-based continuous exchange cell-free systems. *Nature Protocols* 2(11):2945–57 2007. doi: 10.1038/nprot.2007.426.
- Simkin, D., Cavanaugh, E. J., und Kim, D. Control of the single channel conductance of K2P10.1 (TREK-2) by the amino-terminus: role of alternative translation initiation. *The Journal of Physiology* 586(Pt 23):5651–63 2008. doi: 10.1113/jphysiol.2008.161927.
- Soussia, I. B., Choveau, F. S., Blin, S., Kim, E.-J., Feliciangeli, S., Chatelain, F. C., Kang, D., Bichet, D., und Lesage, F. Antagonistic Effect of a Cytoplasmic Domain on the Basal Activity of Polymodal Potassium Channels. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11:301 2018. doi: 10.3389/fnmol.2018.00301.
- Stech, M., Quast, R. B., Sachse, R., Schulze, C., Wüstenhagen, D. A., und Kubick, S. A continuous-exchange cell-free protein synthesis system based on extracts from cultured insect cells. *PLOS ONE* 9(5):e96635 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0096635.
- Su, Z., Brown, E. C., Wang, W., und MacKinnon, R. Novel cell-free high-throughput screening method for pharmacological tools targeting K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(20):5748–5753 2016. doi: 10.1073/pnas.1602815113.
- Takai, K., Sawasaki, T., und Endo, Y. Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. *Nature Protocols* 5(2):227–238 2010. doi: 10.1038/nprot.2009.207.
- Tao, X., Hite, R. K., und MacKinnon, R. Cryo-EM structure of the open high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Nature* 541(7635):46–51 2017. doi: 10.1038/nature20608.
- The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research* 46(5):2699 2018. doi: 10.1093/nar/gky092.
- Triano, I., Barrera, F. N., Renart, M. L., Molina, M. L., Fernández-Ballester, G., Poveda, J. A., Fernández, A. M., Encinar, J. A., Ferrer-Montiel, A. V., Otzen, D., und González-Ros, J. M. Occupancy of Nonannular Lipid Binding Sites on KcsA Greatly Increases the Stability of the Tetrameric Protein. *Biochemistry* 49(25):5397–5404 2010. doi: 10.1021/bi1003712.
- Tristram-Nagle, S., Kim, D. J., Akhunzada, N., Kučerka, N., Mathai, J. C., Katsaras, J., Zeidel, M., und Nagle, J. F. Structure and water permeability of fully hydrated diphytanoylPC. *Chemistry and Physics of Lipids* 163(6):630–637 2010. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2010.04.011.

- van Dalen, A., van der Laan, M., Driessen, A. J. M., Killian, J. A., und de Kruijff, B. Components required for membrane assembly of newly synthesized K⁺ channel KcsA. *FEBS Letters* 511(1-3):51–8 2002.
- van Meer, G., Voelker, D. R., und Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9(2):112–24 2008. doi: 10.1038/nrm2330.
- Vera, A., González-Montalbán, N., Arís, A., und Villaverde, A. The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnology and Bioengineering* 96(6):1101–6 2007. doi: 10.1002/bit.21218.
- Vierra, N. C., Dickerson, M. T., Jordan, K. L., Dadi, P. K., Katdare, K. A., Altman, M. K., Milian, S. C., und Jacobson, D. A. TALK-1 reduces delta-cell endoplasmic reticulum and cytoplasmic calcium levels limiting somatostatin secretion. *Molecular Metabolism* 9:84–97 2018. doi: 10.1016/j.molmet.2018.01.016.
- Wakiyama, M. und Yokoyama, S. Posttranscriptional Control of Protein Synthesis in Drosophila S2 Cell-Free System. In: *Methods in Molecular Biology* Band 1118 Seiten 257–266. Humana Press, Totowa, NJ 2014. doi: 10.1007/978-1-62703-782-2_17.
- Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J., und Terwilliger, T. C. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 17:691–695 1999. doi: 10.1038/10904.
- Wang, W., Putra, A., Schools, G. P., Ma, B., Chen, H., Kaczmarek, L. K., Barhanin, J., Lesage, F., und Zhou, M. The contribution of TWIK-1 channels to astrocyte K(+) current is limited by retention in intracellular compartments. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7:246 2013. doi: 10.3389/fncel.2013.00246.
- Wang, W. und MacKinnon, R. Cryo-EM Structure of the Open Human Ether-à-go-go-Related K⁺ Channel hERG. *Cell* 169(3):422–430.e10 2017. doi: 10.1016/J.CELL.2017.03.048.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., und Barton, G. J. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25(9):1189–1191 2009. doi: 10.1093/bioinformatics/btp033.
- Wong, B. Points of view: Color blindness. *Nature Methods* 8(6):441–441 2011. doi: 10.1038/nmeth.1618.
- Woo, D. H., Han, K.-S., Shim, J. W., Yoon, B.-E., Kim, E., Bae, J. Y., Oh, S.-J., Hwang, E. M., Marmorstein, A. D., Bae, Y. C., Park, J.-Y., und Lee, C. J. TREK-1 and Best1 channels mediate fast and slow glutamate release in astrocytes upon GPCR activation. *Cell* 151(1):25–40 2012. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.005.
- Yanagisawa, M., Iwamoto, M., Kato, A., Yoshikawa, K., und Oiki, S. Oriented reconstitution of a membrane protein in a giant unilamellar vesicle: Experimental verification with the potassium channel KcsA. *Journal of the American Chemical Society* 133(30):11774–11779 2011. doi: 10.1021/ja2040859.
- Zemella, A., Thoring, L., Hoffmeister, C., und Kubick, S. Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems. *ChemBioChem* 16(17):2420–2431 2015. doi: 10.1002/cbic.201500340.
- Zhuang, X., Makover, J. R., Im, W., und Klauda, J. B. A systematic molecular dynamics simulation study of temperature dependent bilayer structural properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838(10):2520–2529 2014. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.06.010.

- Zhuo, R.-G., Liu, X.-Y., Zhang, S.-Z., Wei, X.-L., Zheng, J.-Q., Xu, J.-P., und Ma, X.-Y. Insights into the stimulatory mechanism of 2-aminoethoxydiphenyl borate on TREK-2 potassium channel. *Neuroscience* 300:85–93 2015. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.05.012.
- Zhuo, R.-G., Peng, P., Liu, X.-Y., Yan, H.-T., Xu, J.-P., Zheng, J.-Q., Wei, X.-L., und Ma, X.-Y. Allosteric coupling between proximal C-terminus and selectivity filter is facilitated by the movement of transmembrane segment 4 in TREK-2 channel. *Scientific Reports* 6(1): 21248 2016. doi: 10.1038/srep21248.
- Zúñiga, L. und Zúñiga, R. Understanding the Cap Structure in K2P Channels. *Frontiers in Physiology* 7:228 2016. doi: 10.3389/fphys.2016.00228.
- Zuzarte, M., Heusser, K., Renigunta, V., Schlichthörl, G., Rinné, S., Wischmeyer, E., Daut, J., Schwappach, B., und Preisig-Müller, R. Intracellular traffic of the K⁺ channels TASK-1 and TASK-3: role of N- and C-terminal sorting signals and interaction with 14-3-3 proteins. *The Journal of Physiology* 587(5):929–952 2009. doi: 10.1113/jphysiol.2008.164756.

Danksagung

Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen hätte die vorliegende Arbeit nicht realisiert werden können. Für die vielfältige Hilfe möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Mein Dank gilt zunächst meinem Betreuer Prof. Dr. Thomas Baukrowitz, der meine Arbeit stets mit viel Verständnis unterstützt hat. Dies gilt im Besonderen für die Unterstützung meiner zeitaufwändigen und phasenweise schwierigen Etablierung des Projekts sowie die konstruktive Diskussion meiner Ergebnisse. Besonders möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Beitz und Prof. Dr. Scheidig mit ihren Arbeitsgruppen für die hilfreichen Kooperationen bedanken, ohne die die Untersuchung verschiedener Extrakte nicht möglich gewesen wäre.

Für konstruktive Anregungen, zielführende Diskussionen und wertvolle Hilfestellungen, und nicht zuletzt für die angenehme Arbeitsatmosphäre danke ich meinen wissenschaftlichen Kollegen in der Arbeitsgruppe und am Physiologischen Institut. Für vielfältige Unterstützung im Laboralltag und der Realisierung der Versuchsaufbauten bin ich besonders unseren lieben TAs und den Mitarbeitern der Werkstatt verbunden.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die meine Studien mit großem Engagement verfolgt haben, und schließlich Jane, die mich gerade in der letzten Phase meiner Arbeit mit viel Geduld unterstützt hat.



Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation, abgesehen von der Beratung durch meinen akademischen Lehrer, nach Inhalt und Form selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Des weiteren versichere ich, dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist und alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, kenntlich gemacht sind. Diese Dissertation wurde weder im Ganzen, noch zum Teil an anderer Stelle in einem Prüfungsverfahren vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht. Es wurde mir kein akademischer Grad entzogen. Die gedruckte Form stimmt mit der elektronischen Form überein.

Datum

Marianne Musinszki

