

# **Elektrophysiologische Untersuchung der strukturellen Schaltmechanismen im TREK1-Kanal**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

**Diplom-Chemikerin**

**Friederike Schulz**

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Physiologisches Institut

Kiel, 31.03.2021

Prüfungsdatum 26.11.2021

Akademischer Betreuer:

Prof. Dr. Thomas Baukrowitz

Gutachter:

Prof. Dr. Eric Beitz

---

## Zusammenfassung

TREK-1 K<sup>+</sup>-Kanäle sind physiologisch wichtige Mitglieder der großen Familie der Tandem-Poren-Kanäle (K<sub>2P</sub>-Kanäle) und zeigen eine außergewöhnlich komplexe Regulation durch sehr unterschiedliche Stimuli. Diese umfassen physikalische Reize wie Temperaturerhöhung, mechanischen Stress und Änderung der Membranspannung oder posttranslationale Modifikation wie Phosphorylierungen (u.a. PKA und PKC) und das Binden von physiologischen Liganden wie z.B. ungesättigten Fettsäuren, PIP<sub>2</sub>, Protonen oder Proteinen, wie z.B. AKAP150. Es wird gegenwärtig angenommen, dass diese Stimuli mit unterschiedlichen Bereichen des Proteins wechselwirken, aber letztlich eine gemeinsame Effektorregion nämlich den Selektivitätsfilter (SF) beeinflussen und dadurch öffnen bzw. schließen (Gating). Der Signaltransduktionsmechanismus der diesem Gating zu Grunde liegt, ist aber derzeit wenig verstanden, wobei aber angenommen wird, dass zumindest H<sup>+</sup> über einen pH-Sensor (TREK1-E321) im proximalen cytoplasmatischen C-Terminus ihre Wirkung auf das SF-'Gate' entfalten. TREK-Kanäle wurden in zwei Zuständen kristallisiert, einem 'up-Zustand' (vierte Transmembranhelix (TM4) in Richtung Membran gehoben) und einem 'down-Zustand' (TM4 in Richtung Cytoplasma gesenkt). Eine Begünstigung des 'up-Zustandes' durch mechanischen Stress (z.B. durch Membrankurvatur) gilt als wahrscheinlich und da TREK-1 Kanäle mechanisch aktiviert werden, nimmt man an, dass der 'up-Zustand' die aktive Konformation des Kanals (d.h. des SFs) repräsentiert. Welche Bedeutung die 'down'- / 'up'-Zustandsänderung für Andere (also nicht-mechanische) Aktivierungsvorgänge in TREK-1-Kanälen besitzt, ist gegenwärtig nicht geklärt.

In meiner Arbeit habe ich große Bereiche des TREK-1-Kanales (u.a. TM2, TM4 und den proximalen C-Terminus) mit Hilfe von 82 Punktmutationen (einem sogenannten Cystein-Scan) untersucht. Dabei habe ich 49 Mutationen identifiziert, welche die Grundaktivität (d.h. die Offenwahrscheinlichkeit) des Kanals erhöhen. Eine Projektion dieser Mutationen auf den 'up'- und den 'down'-Zustand legt nahe, dass die Zunahme der Kanalaktivität der Mutationen durch Destabilisierung von Aminosäure-Wechselwirkungen im 'down'-Zustand erfolgt. Dieser Befund impliziert, dass der 'down-Zustand' einen inaktiven Zustand und die Überführung in den 'up-Zustand' einen maßgeblichen Vorgang der Kanalaktivierung darstellt. Im Detail wurden folgende besonders kritische Wechselwirkungen im 'down'-Zustand identifiziert: (i) ein Cluster (Interaktions-Triade) von TREK1-E208 (TM2), -R222 (TM3) und -W310 (TM4), (ii) eine  $\pi$ - $\pi$ -Interaktion von TREK1-F229 (TM3) und -F200 (TM2) und (iii) Reste in der Nähe dieser Wechselwirkungscluster. Die Aktivierung durch sauren intrazellulären pH ist in diesen mutierten TREK-1 Kanälen stark reduziert und impliziert, dass die pH-Aktivierung durch Induktion der 'up'-Konformation hervorgerufen wird.

Des Weiteren wurde die Zustandsabhängigkeit der chemischen Modifizierung der eingeführten Cysteine untersucht. Es wurde eine Reihe von Positionen identifiziert, die im aktivierten Zustand bei pH 5 nur wenig bis gar nicht, aber gut im inaktiven Zustand bei pH 8 modifiziert werden. Diese Ergebnisse sind ebenfalls in prinzipieller Übereinstimmung mit dem Konzept der pH-Aktivierung durch Destabilisierung des 'down'-Zustandes, wenn auch nicht alle Ergebnisse dadurch erklärbar sind.

Die hier dargestellten Ergebnisse erweitern unser Verständnis der strukturellen Aktivierungsmechanismen in TREK-1-Kanälen und implizieren, dass die Stabilisierung des inaktiven 'down'-Zustandes dabei ein zentraler Vorgang ist. Dies ist möglicherweise ebenso für die Aktivierung durch andere Stimuli wie z.B. Temperaturerhöhung, Interaktion mit anderen Proteinen oder Phosphorylierungen von Bedeutung und kann nun in weiteren Arbeiten untersucht werden.

---

## Abstract

TREK1 K<sup>+</sup>-channels are physiologically important members of the large family of tandem pore channels (K<sub>2P</sub>-channels) and show an extraordinary complex regulation via diverse stimuli. This contains physical stimuli as increase in temperature, mechanical stress and changes in membrane voltage conditions or posttranslational modifications like phosphorylation (a.o. PKA and PKC) and binding of physiological ligands, f.e. unsaturated fatty acids, PIP<sub>2</sub>, protons or proteins, like AKAP150. It is currently supposed, that these stimuli interact with different regions of the protein, but finally affect a common effektorregion, the selectivity filter (SF), thereby opens and closes the channel (gating). The mechanism of signal transduction that underlies this gating, is currently less understood, but it is accepted that at least H<sup>+</sup> transduce its effect via a pH-sensor (TREK1-E321), located in the proximal cytoplasmatic C-terminus, to the SF-gate. TREK channels were crystallized in two configurations, an 'up'-state (fourth transmembranehelix (TM4) uplifted to the membrane) and a 'down'-state (TM4 brought down in the direction of the cytoplasm). It seems probable that mechanical stress (f.e. by membrane curvature) favors the 'up'-state and because TREK1 channels were mechanically activated, it is supposed that the 'up'-state represents the active conformation of the channel (that means the active SF). What relevance the alteration between 'down'- and 'up'-states possess for other (not mechanical) activation mechanisms is presently not known.

In my work I examined large regions of the TREK1 channel (a.o. TM2, TM4 and the proximal C-terminus) using 82 point mutations, in a so called cysteine scan. Thereby I identified 49 mutations showing an increase in the basal activity (that means the open probability). Projection of these mutations onto the 'up'- and 'down'-states suggest that the increase in channel activity of the mutations results from destabilization of amino acid interactions in the 'down'-state. This finding implicates that the 'down'-conformation represents the inactive state and the conversion to the 'up'-state is a relevant mechanism of channel activation. In detail, my examination identified the following particularly critical interactions of the 'down'-state: (i) a cluster (interaction-triad) comprising TREK1-E208 (TM2), -R222 (TM3) and -W310 (TM4), (ii) a  $\pi$ - $\pi$ -interaction of TREK1-F229 (TM3) and -F200 (TM2) as well as (iii) residues close to these interaction-clusters. The acidic intracellular activation was reduced severely in these mutations, implicating that the pH-activation is induced by induction of the 'up'-conformation.

Furthermore the state dependency of chemical modifications of the cysteine mutations was examined. There was a rash of positions showing less or no modification in the active state at pH 5, whereas being well modified in the inactive state at pH 8. These findings are also in principle conformity with the concept of pH-activation via destabilization of the 'down'-state, even if not all results are explainable thereby.

The described findings extend our understanding of the structural activation mechanisms in TREK1 channels and implicate, that the stabilization of the inactive 'down'-state is a central process in channel gating. This is possibly of importance for the activation via other stimuli, like f.e. increase in temperature, interaction with other proteins or phosphorylation and can be examined in further studies now.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Hintergrund</b>	<b>4</b>
1.1	Die Kalium-leitenden Ionenkanäle	5
1.2	Die $K_{2P}$ -Kanalfamilie und ihre Charakteristika	7
1.3	Die Modulatoren der TREK/TRAAK-Subfamilie	10
1.4	Physiologische Relevanz der pH-Aktivierung des TREK1-Kanals	14
1.5	Forschungsansatz und Fragestellung	15
<b>2</b>	<b>Methoden und Auswertung</b>	<b>16</b>
2.1	Die Patch-Clamp-Technik	16
2.2	Bestimmung des $EC_{50}$ -Wertes der pH-Aktivierung von TREK-Kanälen	19
2.3	Abschätzung der relativen Offenwahrscheinlichkeit	21
2.4	Chemische Modifikation von Cysteinen zur Untersuchung von Ionenkanälen	22
2.5	Darstellung der Proteinstrukturen	23
2.6	Präparative Methoden	23
2.6.1	Systematische Einführung von Cysteinen durch DNA-Mutagenese	23
2.6.2	RNA-Synthese aus DNA-Plasmiden	24
2.6.3	Präparation der Oozyten	24
2.7	Aufbau und Messpraxis der Patch-Clamp-Technik	25
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
3.1	Intrazelluläres pH-Gating der TREK/TRAAK-Subfamilie	26
3.2	Cystein-Mutagenese identifiziert funktionell kritische Aminosäuren	27
3.2.1	Der C-Terminus und $pH_i$ -sensorische Bereiche	30
3.2.2	Die Interaktionstriade der Porensegmente M2, M3 und M4	35
3.2.3	Die kritische Region unterhalb des Glycin-Knicks des M2-Segmentes	37
3.2.4	Die Umgebung des Selektivitätsfilters	38
3.3	Die $pH_i$ -induzierten Porensegmentbewegungen	40
3.3.1	Die Analyse der $pH_i$ -induzierten Porensegmentbewegungen des TREK1-Kanals	41
3.3.2	Die Modifikationsvarianten Cystein-substituierter TREK1-Kanäle	42
3.3.3	Die Modifikationseffekte auf Cystein-Einzelmutationen der TREK1-Porensegmente	44
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>54</b>
4.1	Die protoneninduzierte Bewegung der Porensegmente des TREK1-Kanals	55
4.2	Die funktionell kritischen Regionen des TREK1-Kanals	60
4.2.1	Manipulation der Domänentriade über primäre und sekundäre $pH_i$ -Sensoren	60
4.2.2	Die kritischen Regionen um den Selektivitätsfilter	63
4.3	Modell zur allosterischen Übertragung von $pH_i$ -Signalen in der TREK/TRAAK-Subfamilie	64
4.4	Die $pH_i$ -Aktivierung in $K_{2P}$ - und anderen Ionenkanälen	68
<b>5</b>	<b>Anhang</b>	<b>71</b>
5.1	Verwendete Materialien	71
5.2	Wertetabellen	74
5.3	Abkürzungen, Tabellen-, Abbildungs- und Literaturverzeichnis	80
5.4	Danksagung und Eidesstattliche Erklärung	93

## 1 Hintergrund

Im Rahmen der Homöostase, Hormonausschüttung, des Wachstums und der Differenzierung von Zelltypen, sowie zur Erregung und Weiterleitung in zentralen und peripheren Nervensystemen, ist die Einbettung von regulierbaren Kanalporen in Plasma- und intrazelluläre Membranen der Zellen essentiell. Bis zu  $10^8$  Ionen pro Sekunde können dabei durch Ionenkanäle über die Membran fließen, wodurch die Flussrate gegenüber Transportprozessen, welche von Adenosintriphosphat (ATP) abhängen, etwa  $10^6$ -fach erhöht ist. Durch schnellen Wechsel zwischen geschlossenen und geöffneten Zuständen der Kanalstruktur wird der Ionenfluss durch die Membran verändert (englisch 'Gating') und so das Membranpotential reguliert. Das Potential ist dabei streng abhängig von der Ionenverteilung der intra- und extrazellulären Medien und über die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung beschreibbar. Die Untersuchungen einzelner Ionenkanäle zeigen jeweils einen oder mehrere charakteristische Leitfähigkeitszustände jedes Ionenkanaltyps. Die zumeist hohe Selektivität für eine Ionenart gewährleistet dabei die gezielte Steuerung biologischer Funktionen, wobei aber auch unselektive Kanäle beschrieben sind.

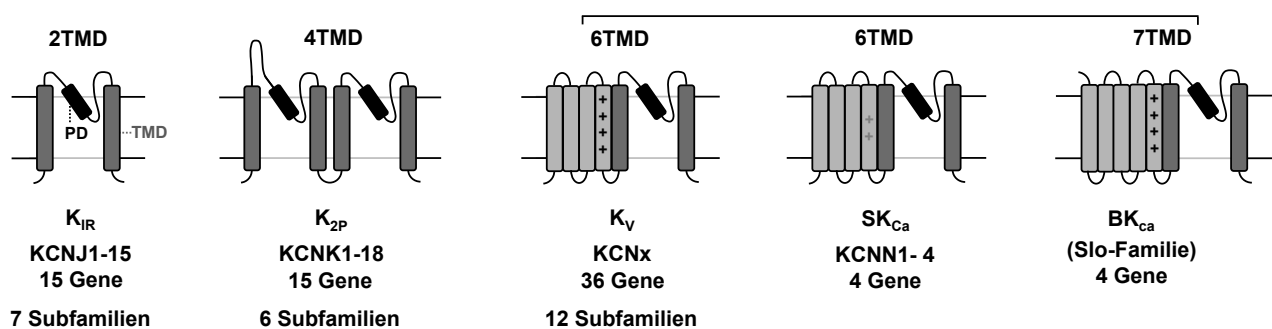
Der ATP-unabhängige Membranfluss von Ionen ist besonders zur Regulation erregbarer Zellen wie Nerven-, Muskel- und Sinneszellen wesentlich und ermöglicht die Entstehung und Ausbreitung von Aktionspotentialen über spannungsgesteuerte Kationenkanäle ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{K}^+$ ). Hydrophobizitäts- und Kristallstrukturanalysen enthüllten eine Reihe struktureller und funktioneller Gemeinsamkeiten der klassischen spannungsregulierten Kationenkanäle ( $\text{Na}_V$ ,  $\text{Ca}_V$  und  $\text{K}_V$ ). Der prinzipielle Aufbau basiert auf einer Grundeinheit aus sechs Transmembrandomänen (TMD1-6 bzw. S1-6 (Segment)) und einer Porendomäne (PD), welche von den porenbildenden Segmenten S5 und S6 flankiert wird und die Selektivitätsfiltercodierung beinhaltet. Die Segmente S1-S4 gelten als sensorische Einheit und die C- und N-Termini dieser Untereinheiten liegen jeweils im Cytoplasma (6TMD, Abbildung 1). Im Falle spannungsregulierter Kaliumkanäle bilden sich funktionelle Tetramere aus homo- oder heteromeren 6TMD-Untereinheiten, wohingegen  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle aus je einer Einheit von vier sich wiederholenden 6TMD-Strukturen bestehen und durch symmetrische Zusammenlagerung pseudo-tetramere Proteinstrukturen ausbilden. Entsprechend entsteht durch die Variation von Eigenschaften und Anzahl der TMD, sowie der homo- oder heteromeren Zusammenlagerung, eine immense Vielfalt von spezifischen Ionenkanälen, besonders unter Berücksichtigung von Interaktionen mit zusätzlichen  $\beta$ -Untereinheiten und Spleiß-Varianten.

Ionenkanäle können zudem durch verschiedenste Botenstoffe reguliert werden. Freie Liganden aus dem intra- oder extrazellulären Milieu besetzen hierzu spezifische Bindungsstellen der Kanalproteine. Die kovalente Bindung oder ionische Wechselwirkung mit dem Liganden induziert eine Konformationsänderung des Proteins und beeinflusst so den Ionenfluss durch das Membranprotein (ionotroper Rezeptor). Auch die Kopplung von Ionenkanälen an räumlich getrennte Membranrezeptoren ist möglich. Liganden binden hierzu an einem Rezeptorprotein (second messenger Rezeptor), welches mit dem Kanal interagieren kann.

Neben Gatingmechanismen wie der Spannungs- oder Ligandenregulierung, zeigen viele der beschriebenen Ionenkanäle eine Sensitivität für den pH-Wert ihrer Umgebung. Veränderte Wechselwirkungen durch Titration der geladenen Aminosäure-Seitenketten Glutamat ( $-\text{E}^-$ ), Aspartat ( $-\text{D}^-$ ), Arginin ( $-\text{R}^+$ ), Histidin ( $-\text{H}^+$ ) und Lysin ( $-\text{K}^+$ ) können Gating-relevante Bewegungen der Proteinstruktur hervorrufen. Daher spielen Schwankungen der Protonenkonzentrationen eine Schlüsselrolle bei der metabolischen Regulation und Entwicklung von Zellen [Busa & Nutricelli, 1984; Busa, 1986].

## 1.1 Die Kalium-leitenden Ionenkanäle

Aufgrund ihrer spezifischen Funktionen bei der Zellhomöostase, der Hormonsekretion und besonders zur Repolarisation und Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials, stellen  $K^+$ -leitende Ionenkanäle die Kanalklasse der größten Vielfalt dar. Im Allgemeinen bilden sie funktionelle Tetramere aus vier homo- oder heteromeren Untereinheiten und formen so eine  $K^+$ -selektive Pore [Doyle et al.,1998], durch welche  $10^6$ - $10^8$   $K^+$ -Ionen pro Sekunde diffundieren können. Dies entspricht einer Ionenleitfähigkeit von etwa 3 bis 300 pS (Picosiemens) [Hille,2001; Gonzalez et al.,2012]. Die Einteilung der großen Variationsbreite dieser Kanalproteine erfolgt anhand struktureller und funktioneller Eigenschaften ([Hille,2001], Abbildung 1, Säuger- $K^+$ -Kanalfamilien), wobei allen die Konsensussequenz  $-(T/S)xG(Y/F)G-$  innerhalb der porenbildenden Domänen (PD) gemein ist [Heginbotham et al.,1992/1994, McCoy und Nimigean,2011].



**Abbildung 1:** Einteilung mammaler Kaliumkanäle anhand der Anzahl ihrer Transmembrandomänen (TMD).  $K_{IR}$ -Kanäle (Gene KCNJ1-15) mit 2TMD-Untereinheiten tetramerer Anordnung enthalten zentral je eine Porenbildendomen (PD) und cytoplasmatisch lokalisierte N- und C-Termini. Die 15  $K_{2P}$ -Mitglieder (KCNK1-18) bilden Dimeren aus 2TMD-Tandem-Strukturen und formen so 4TMD-Untereinheiten mit je zwei PD und zusätzlich verlängerter TMD1-PD1-Schleife. Die porenbildenden 2TMD-Abschnitte einer 6TMD-Grundstruktur tetramerisieren und formen funktionelle Kanäle mit 4 zusätzlichen TMD regulatorischen Charakters pro Untereinheit. Die Spannungsregulierung ('Voltage-Gating') der 36  $K_V$ -Kanäle wird durch positiv geladene Seitenketten, primär des vierten TMD, ermöglicht und ist gemeinsames Merkmal mit  $Ca^{2+}$ -aktivierten  $BK_{Ca}$ -Kanälen der 7TMD-Struktur bei extrazellulärem N-Terminus. 6TMD- $SK_{Ca}$ -Kanäle zeigen keine Spannungsaktivierung und wie  $BK_{Ca}$ -Kanäle nur vier mammale Gene.

Die Einordnung in Subfamilien innerhalb der großen Kaliumkanalfamilien  $K_{IR}$ ,  $K_{2P}$  und  $K_V$  basiert auf den funktionellen Eigenschaften und Strukturhomologien unter den Mitgliedern. Innerhalb der Familien der  $SK_{Ca}$ - und  $BK_{Ca}$  (Slo) - Kanäle sind nur jeweils vier codierende Gene bekannt, daher entfällt eine weitere Unterteilung. Die Charakteristika der Kanalfamilien  $K_V$ ,  $K_{Ca}$ ,  $K_{IR}$  und  $K_{2P}$  sollen im folgenden kurz erläutert werden.

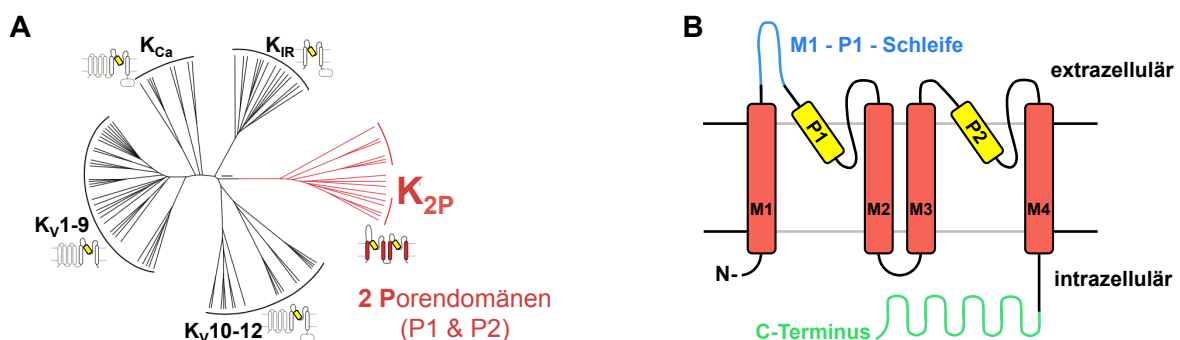
Die Familie der spannungsregulierten  $K_V$ -Kanäle ('voltage-gated potassium channels') stellt mit 36 Genen mit Abstand die vielfältigste Kaliumkanalklasse dar und ist in 12 Subfamilien untergliedert [González et al.,2012]. Die Unterfamilien werden anhand ihrer Aktivierungsgeschwindigkeiten in schnelle ( $K_V$ 1-4; 7) und langsame ( $K_V$ 10 – 12) Rektifizierer eingeteilt [Hille,2001]. Die Proteine der  $K_V$ -Subfamilien 5, 6, 8 und 9 bilden selbst keine funktionellen Kanäle, erhöhen aber die  $K_V$ -Vielfalt durch Heteromerbildung mit  $K_V$ 2- und  $K_V$ 3-Untereinheiten [Hugnot et al.,1996; Ottschytch et al.,2002; Sano et al.,2002]. Allen  $K_V$ -Kanälen ist die 6TMD-Struktur, mit porenformender S5-PD-S6-2TMD-Region (Abbildung 1, dunkel) und vier weiteren Transmembrandomänen S1-S4 gemein. Vorwiegend das sensorische S4-Segment enthält eine Reihe von positiv geladenen Aminosäuren, welche spannungsbedingte Konformationsänderungen initiieren [Aggrawal & MacKinnon,1996]. Nach einer De-

polarisation diffundiert  $K^+$  in Auswärtsrichtung und führt so zur Repolarisation erregbarer Zellen nach einem Aktionspotential. Der Typus des  $K_V$ -Kanals bestimmt die Dauer des Erregungspotentials.

Durch Calcium aktivierte Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ) zählen aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften zu den 6TMD-Kanälen. Eine Ausnahme bilden die Kanäle Slo1 und Slo3 der  $BK_{Ca}$ -Familie, welche sieben Transmembrandomänen aufweisen (Abbildung 1). Das zusätzliche TMD mit extrazellulärem N-Terminus wird dabei als S0-Segment bezeichnet. Der Spannungssensor liegt, wie auch in  $K_V$ -Kanälen, strukturell in der S4-Helix. Mit Leitfähigkeiten von etwa 250 pS, wie im Falle des Slo1 [Palotta et al.,1981; Marty,1981; Latorre et al.,1982], zeigen  $BK_{Ca}$ -Einzelkanäle ('big-potassium channels') sehr hohe Leitfähigkeiten. In analoger Weise werden  $K_{Ca}$ -Kanäle sehr geringer Einzelkanalleitfähigkeiten von 10 bis 14 pS, als  $SK_{Ca}$ -Familie ('small-potassium') zusammengefasst [Blatz,1986; Park,1994]. Die 6TMD- $SK_{Ca}$ -Strukturen enthalten zwar auch einige positive Ladungen in den S4-Sensorsegmenten, zeigen aber keine Spannungsregulierung.

$K_{IR}$ -Kanalstrukturen mit zwei Transmembrandomänen (2TMD, Abbildung 1) sowie einer zentralen Porendomäne stellen die funktionelle Grundeinheit von Kaliumkanalporen dar (Abbildung 1). N- und C-Termini sind cytoplasmatisch lokalisiert, wobei die ausladenden C-Termini eine intrazelluläre Pore bilden. Es existieren 15 bekannte Gene (KCNJ1-15, [González et al.,2012]) die  $K^+$ -leitende Kanäle dieser 2TMD - Grundeinheit codieren. Diese wurden in sieben Subfamilien ( $K_{IR}$ 1-7) eingeteilt und anhand ihrer Eigenschaften in vier Gruppen kategorisiert, wobei Kanäle aller Subfamilien intrazelluläre pH-Sensitivität zeigen [Baukowitz et al.,1999; Hibino et al.,2010, Sepulveda et al.,2015]. Die Benennung dieser Gruppierung als  $K_{IR}$ -Kanalfamilie erfolgte aufgrund ihrer 'einwärtsgerichtenden' ('inward rectifier') Eigenschaften. Kanäle dieses Typus leiten Ströme vorwiegend in Einwärtsrichtung und zeigen in nativer Zellumgebung nur sehr geringe Auswärtsströme. Dies ist überwiegend auf einen spannungsabhängigen Block der Pore durch intrazelluläres  $Mg^{2+}$  und Polyamine, wie Spermin, zurückzuführen [Fakler et al.,1994/1995; Lopatin et al.,1994].  $K_{IR}$ -Kanäle sind daher primär an Hyperpolarisationsphasen und an der Stabilisierung des Ruhepotentials der Zellen beteiligt.

Im Gegensatz zu den  $K_V$ ,  $K_{Ca}$  und  $K_{IR}$ -Kanälen assemblieren  $K_{2P}$ -Kanäle als pseudo-tetramere Dimere. Pro Untereinheit enthalten sie entsprechend zwei Porendomänen (2P, 'two-pore-domain'), welche jeweils die  $K^+$ -Konsensus-sequenz -(T/S)TxG(Y/F/L)G- tragen (Sequenzvergleich aus Uniprot-GenBank, Kennnummern siehe Anhang). Abbildung 2 zeigt ein veranschaulichendes Kaliumkanal-Dendrogramm (A) und den Aufbau, sowie die spezielle Nomenklatur, von  $K_{2P}$ -Untereinheiten (B).

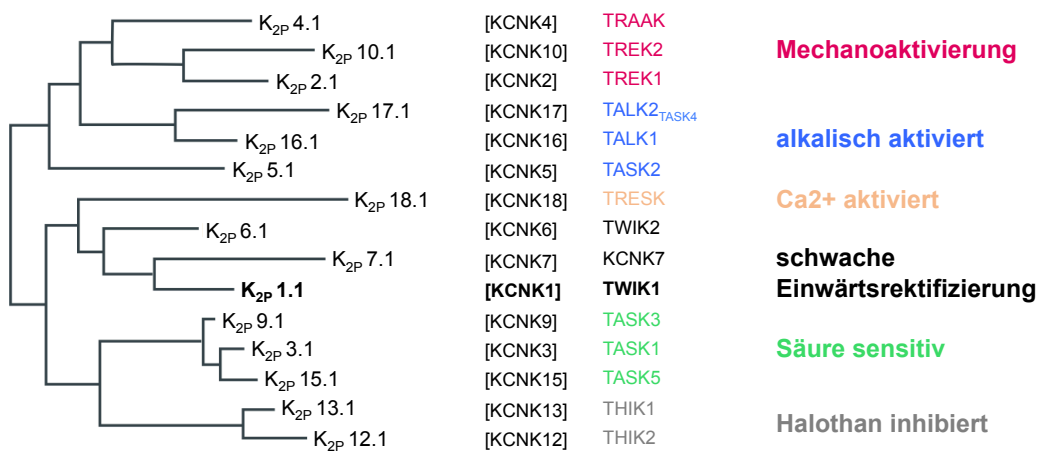


**Abbildung 2:** A: Dendrogramm der Kaliumkanäle modifiziert nach Browhan et al. [2012]. B: Schematische Struktur einer  $K_{2P}$ -Untereinheit. TMD von  $K_{2P}$ -Kanälen werden N-terminal beginnend als M1 bis M4 (rot) und die PD als P1 und P2 (gelb) benannt.  $K_{2P}$ -Untereinheiten weisen stets eine verlängerte, extrazelluläre M1-P1-Schleife (blau) und einen zumeist ausladenden, cytoplasmatischen C-Terminus (grün) auf.

Die vier Transmembran- (M1-M4) und die Porendomänen (P1 und P2) sind jeweils mit intra- und extrazellulären Aminosäureschleifen verbunden. Die Porendomäne P1 ist zwischen M1 und M2, P2 zwischen M3 und M4 lokalisiert. Durch Zusammenlagerung zweier Unterheiten entsteht aus vier Porendomänen der funktionelle Selektivitätsfilter mit nahezu perfekter vierfach-Symmetrie, bei gleichzeitiger zweifach-Symmetrie des  $K_{2P}$ -Kanals [Browhan et al., 2012]. Alle Kanäle dieser Familie weisen eine verlängerte M1-P1-Schleife auf (Abbildung 2, blau), die Längen von N- und C-Termini (Abbildung 2, grün) variieren je nach  $K_{2P}$ -Kanal.

## 1.2 Die $K_{2P}$ -Kanalfamilie und ihre Charakteristika

Die Entdeckung von Kaliumkanälen mit Zwei-Porendomänen gelang mit Hilfe eines DNA-Sequenzabgleiches im Genom des *Saccharomyces cerevisiae* anhand des konservierten Motivs der  $K^+$ -selektiven Porendomänen [Ketchum et al.,1995]. Der gefundene TOK1-Kanal formt funktionelle Untereinheiten aus zwei Poren-(2P)- und acht Transmembrandomänen und zeigt auswärtsrektifizierende Eigenschaften. Sequenzanalysen in Säuger-Gen-Datenbanken führten dann zur Entdeckung von  $K_{2P}$ -Kanälen mit 4-TMD-Struktur [Lesage et al.,1996b]. Im Wurm *Caenorhabditis elegans* repräsentieren diese Kanäle mit etwa 46 Genen die größte Familie, wobei einige mit ungewöhnlichen Porendomänen nicht zwingend kaliumselektiv sind [Wei et al.,1996; Bargmann,1998]. In Säugetieren ist diese Vielfalt auf 15 Gene beschränkt (KCNK1-18), deren exprimierte Kanäle anhand ihrer Aktivierungsstimuli in sechs Subfamilien untergliedert werden (Abbildung 3).



**Abbildung 3:**  $K_{2P}$ -Kanal-Dendrogramm der 15 humanen Gene mit Einteilung der Kanäle in sechs Subfamilien. Mitglieder der TWIK-Subfamilie (schwarz) zeigen als einzige  $K_{2P}$ -Kanäle schwache Einwärtsrektifizierung. Mechanoaktivierung ist der TREK/TRAAK-Subfamilie (rot) vorbehalten, der TRESK-Kanal (beige) wird mittels  $Ca^{2+}$ -aktiviert und THIK-Kanäle (grau) zeigen sich durch Halothan inhibierbar. Die protonensensitiven TALK-Kanäle (blau) werden über den extrazellulären pH-Wert alkalisch aktiviert, wohingegen TASK-Kanäle (grün) im neutralen geöffnet sind und bei Erhöhung der extrazellulären Protonenkonzentration inhibiert werden.

Als erster 4-TMD- $K_{2P}$ -Kanal wurde 1996 der humane, pH-sensitive TWIK1-Kanal ('Two-pore domain weakly inward rectifier  $K^+$ -channel) mit einer Einzelkanalleitfähigkeit von 34 pS beschrieben [Lesage et al.,1996a]. Mit dem TWIK-2 und dem bisher nicht exprimierbaren KCNK7 wird er in der Unterfamilie der 'schwachen Einwärtsrektifizierer' zusammengefasst [Chavez et al.,1999; Salinas et al.,1999]. Der ihm verwandte, 'TWIK-Related'-Kaliumkanal, TREK1 zeigt hingegen mit 100 pS eine deutlich höhere Einzelkanalleitfähigkeit und zu-



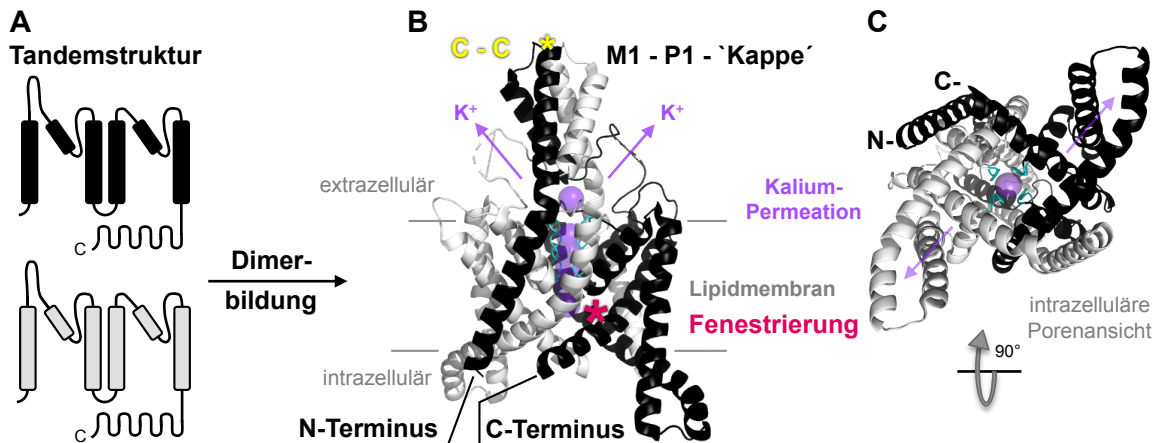
dem auswärtsrektifizierende Eigenschaften [Fink et al.,1996; Ohara et al.,2006]. Er ist durch Membrantensionen aktivierbar und bildet zusammen mit dem TRAAK ('TWIK-related arachidonic acid-stimulated  $K^+$  channel') und dem TREK2-Kanal die mechanosensitive und polymodal aktivierbare TREK/TRAAK-Subfamilie (Abbildung 3) [Fink et al.,1998; Bang et al.,2000].

Die Mitglieder der TASK und TALK-Subfamilien zeichnen sich primär durch ihre Regulierbarkeit über extrazelluläre pH-Veränderungen aus. TASK1 und TASK3 ('TWIK-related acid-sensitive  $K^+$  channel') sind bei neutralem pH-Wert aktiv und werden durch extrazelluläre Azidifizierung inhibiert [Duprat et al.,1997; Kim et al.,2000; Rajan et al.,2000]. Der TASK2-Kanal [Reyes et al.,1998] zählt hingegen, aufgrund seiner geringen Aktivität bei neutralem pH, zur TALK-Subfamilie ('TWIK-related alkaline-sensitive  $K^+$  channel'). Diese  $K_{2P}$ -Kanäle sind bei alkalischem Extrazellulärmedium aktiviert und im Neutralen weitgehend (TASK2, TALK1) oder völlig inhibiert (TALK2) [Kang & Kim,2004]. Der nur durch extreme Verschiebungen als pH-regulierbar beschriebene TRESK-Kanal ('TWIK-related spinal cord  $K^+$  channel') wird durch  $Ca^{2+}$  aktiviert und weist eine lange intrazelluläre, regulatorische M2-M3-Schleife auf [Sano et al.,2003]. THIK1 und THIK2 ('Tandem pore domain halotane-inhibited  $K^+$  channel') bilden die Gruppierung der Halothan-inhibierten  $K_{2P}$ -Kanäle und sind laut der Literatur weitgehend pH-insensitiv [Rajan et al.,2001; Bichet et al.,2015]. Die elektrophysiologischen Eigenschaften des KCNK7 und TASK5 sind bis dato nicht aufgeklärt, da keine funktionellen Kanäle gebildet werden.

Die meisten Mitglieder der  $K_{2P}$ -Kanalfamilie sind im zentralen und peripheren Nervensystem des Menschen exprimiert [Medhurst et al.,2001; Talley et al.,2001] und zeigen zeit- und spannungsabhängige Auswärtsrektifizierung [Schewe et al.,2016]. Einzelkanalmessungen zeigen hingegen Einwärtsrektifizierung, negative Membranspannungen erzeugen demnach höhere Leitfähigkeiten der einzelnen Kanäle und eine Depolarisation erhöht ihre Offenwahrscheinlichkeit. Ohne weitere Stimulation sind  $K_{2P}$ -Kanäle beim Ruhemembranpotential also eher im inaktiven Zustand, wodurch ihre primäre Aufgabe weniger in der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials, sondern vielmehr in der Repolarisation von Aktionspotentialen gesehen wird. Ihre  $K_V$ -ähnlichen Öffnungskinetiken, sowie die co-lokalisierte Expressionen von  $K_V$ - und  $K_{2P}$ -Kanälen im zentralen und peripheren Nervensystem legen eine Beteiligung an neuronalen und kardialen Aktionspotentialen nahe. Wobei  $K_{2P}$ -Kanäle eine Zelle auch in Abwesenheit von  $K_V$ -Kanälen repolarisieren können [MacKenzie et al.,2015].

Die erstmalige Aufklärung von  $K_{2P}$ -Proteinstrukturen gelang 2012 anhand des TRAAK- (Abbildung 4B, 'Protein Data Base'-Kennnummer (PDB-ID): 4WFE [Browhan et al.,2012]), sowie des TWIK1-Kanales [Miller & Long,2012]. Die Assemblierung zweier Tandemstrukturen (Abbildung 4A) führt zumeist zur Ausbildung einer stabilen Disulfid-Verbrückung (Abbildung 4B, C-C, gelb) [Lesage et al.,1996c; Lesage & Lazdunski,2000], zusätzlich zu den elektrostatischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken innerhalb der Proteinsegmente. Dimerisierung formt einen funktionellen, nahezu spiegelsymmetrischen Kanal, mit pseudo-tetramerer Anordnung der PD im Selektivitätsfilter (Abbildung 4C, cyan). Interaktion der M1-P1-Schleifen resultiert in einer Kappenstruktur, welche den Ionenfluss durch zwei seitlich gelagerte, tunnelartige Zugänge zum Selektivitätsfilter gewährleistet und die extrazelluläre Seite des Kanals vor der Bindung von Toxinen oder klassischen  $K^+$ -Kanalblockern, wie quartären Ammoniumionen ( $QA^+$ ) schützt [Browhan et al.,2012]. Zudem offenbaren die Kristallstrukturen seitliche Kanal-Fenestrierungen unterhalb des Selektivitätsfilters mit Zugang zur Lipiddoppelschicht und bestätigen den konstitutiv offenen Zustand des, in anderen  $K^+$ -Kanälen regulierenden, unteren Porenverschlusses ('helix bundle crossing') [Piechotta et al.,2011].

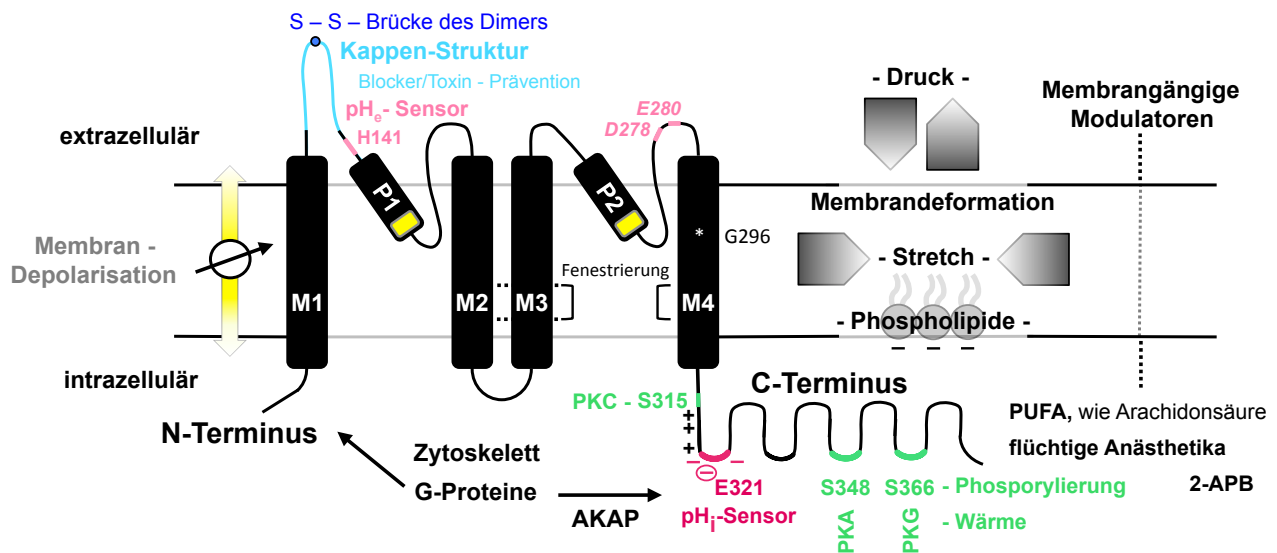
Die N- und C-Termini der integralen Membransegmente M1 und M4 ragen beide in das Cytosol der Zellen, so dass sie nur für membrangängige oder cytoplasmatisch gebildete Regulatoren erreichbar sind. Die cytosolischen Termini, wie auch die extrazellulären Schleifen, weisen sensorische Bereiche auf und sind daher von großem Interesse bei der mechanistischen Aufklärung der großen Variationsbreite von  $K_{2P}$ -Kanalregulatoren.



**Abbildung 4:** **A:** Dimerbildung zweier  $K_{2P}$ -Untereinheiten formt das  $K^+$ -leitende Membranprotein. **B:** Kristallstruktur eines  $K_{2P}$ -Kanals (Mitte, TRAAK, PDB-ID: 4WFE [Browhan et al.,2012]) mit  $K^+$ -Permeation (violett) durch den Selektivitätsfilter (cyan) geformt aus den Untereinheiten 1 (schwarz) und 2 (grau), zumeist kovalent verknüpft durch eine Disulfidverbrückung (C-C, \* ,gelb). Die verlängerten M1-P1-Schleifen assemblieren zu einer extrazellulären Kappe, wohingegen N- und C-Termini cytoplasmatisch lokalisiert sind und nur mit der Lipidmembran interagieren, interne Protein-Protein-Wechselwirkungen der Termini wurden bis dato nicht gezeigt. Verlagerung der M4-Helix öffnet und schließt eine seitliche Fenestrierung (rot), welche bei Öffnung die Pore des  $K_{2P}$ -Kanals direkt mit der Lipidmembran verbindet. **C:** pseudo-tetrameres TRAAK-Dimer (PDB-ID: 4WFE [Browhan et al.,2012]) in intrazellulärer Porenansicht.

### 1.3 Die Modulatoren der TREK/TRAAK-Subfamilie

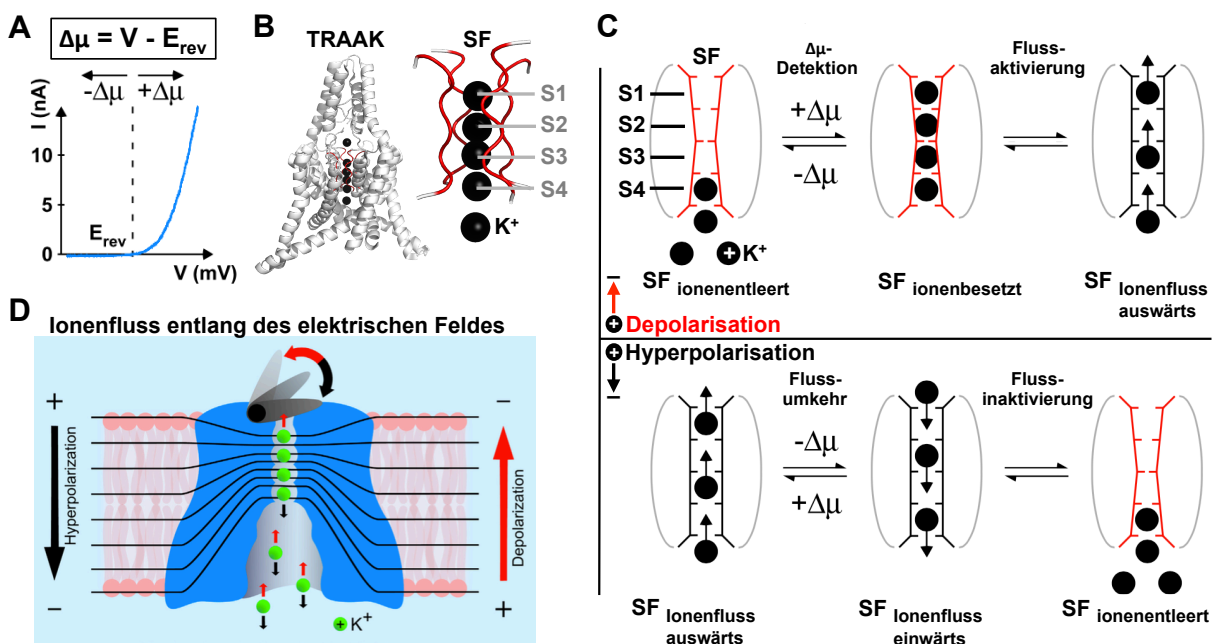
Mitglieder der TREK/TRAAK-Subfamilie werden durch eine Vielzahl physikalischer und chemischer Regulatoren beeinflusst. Die Stimulation über mechanischen Stress mittels Druckapplikation, osmotischer Zellschwellung (Stretch) oder Verdichtung der Lipiddoppelschicht, ist dabei das herausragende Merkmal der Subfamilie. Abbildung 5 zeigt eine Auswahl bereits identifizierter Modulatoren und ihrer Wirkorte in einer TREK1-Untereinheit.



**Abbildung 5:** Schema der polymodalen Regulation am Beispiel des TREK1-Kanals. Die extrazelluläre Kappe, geformt aus den ausgedehnten M1-P1-Schleifen (blau), schützt den funktionellen Kanal vor Blocker- oder Toxinbindung. Membrandepolarisation (gelb) wirkt direkt auf den Selektivitätsfilter und die Kopplung an G-Proteine erfolgt am N- oder C-Terminus des TREK1-Kanals. Stimulatoren wie Membrandeformationen (Druck, Membranstretch oder Lipideinbettung), PUFA ('polyunsaturated fatty acids'), flüchtige Anästhetika, Phosphorylierung und Wärme sind C-Terminus assoziiert. Ebenso wie die intrazelluläre pH-(pH<sub>i</sub>)-Aktivierung (rot) des TREK1-Kanals über die Neutralisierung des pH<sub>i</sub>-sensorischen E321<sup>-</sup> durch hohe Protonenkonzentrationen. Die extrazelluläre pH-(pH<sub>e</sub>)-Regulation (rosa) erfolgt durch Titration des P1-vorgelagerten H141, welches bei niedrigem pH<sub>e</sub> mit D278<sup>-</sup> und E280<sup>-</sup> in Wechselwirkung steht.

Entgegen der ersten Klassifizierung der K<sub>2P</sub>-Kanäle als spannungsunabhängige Leck- oder Hintergrundkanäle scheint der, für die K<sub>2P</sub>-Kanäle namensgebende, TWIK1-Kanal ironischer Weise der einzige nicht spannungsabhängige K<sub>2P</sub>-Kanal zu sein. In einer Strom-Spannungsauftragung (I-V-Graph), solcher Hintergrundkanäle, zeigen sich lineare Stromverläufe, also vergleichbar starke Aktivierungen bei negativen und positiven Membranpotentialen, welche durch die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung beschreibbar sind. Die meisten K<sub>2P</sub>-Kanäle zeigen allerdings keinen linearen Strom-Spannungsverlauf, sondern eine klare Rektifizierung des Ionenflusses in Auswärtsrichtung (Abbildung 6A, [Schewe et al., 2016]). Die Spannungsaktivierbarkeit zeigte sich dabei nicht allein von der Membranspannung (V) abhängig, sondern vielmehr von der elektrochemischen Triebkraft  $\Delta\mu$ , welche sich aus der Differenz zwischen gemessener Spannung (V) und vorliegendem Umkehrpotential ( $E_{rev}$ ) ergibt und das elektrische Feld des Selektivitätsfilters berücksichtigt. Positive  $\Delta\mu$ -Werte weisen demnach auf Membranpotentiale oberhalb des Umkehrpotentials hin und bei negativen Werten liegen die Potentiale unterhalb dieser Umkehrgrenze der Ionenflussrichtung (Abbildung 6A).

Eine Aufklärung der Proteinstruktur des TRAAK-Kanals zeigte vier Kaliumionen innerhalb des Selektivitätsfilters (SF) an den Selektivitätsfilterbindungsstellen S1 bis S4 (Abbildung 6B, PDB-ID: 4WFE [Browhan et al.,2012]) im leitenden Zustand des Kanals. Im spannungsinaktiven Zustand des Kanals ist der SF nur gering besetzt (ionenentleert, Abbildung 6C, [Schewe et al.,2016]). Das durch eine Depolarisation mit positivem  $\Delta\mu$ -Wert entstehende elektrische Feld des Filters treibt 3 bis 4 Kaliumionen in den SF hinein und sorgt für eine volle Besetzung der Bindungsstellen S1 bis S4. Dieser hoch geladene Zustand des SF ist allerdings nicht stabil und geht in den auswärts leitenden Zustand des Filters über. Eine anschließende Umkehr der elektrochemischen Triebkraft (mit negativem  $\Delta\mu$ -Wert, Hyperpolarisation) zeigte einen kurzen Einwärtsstrom von Kaliumionen, bevor dieser instabile Zustand des SF den Kanal inaktiviert und der initiale, ionenentleerte Zustand des SF resultiert. Abbildung 6D zeigt diesen Ionenflussmechanismus entlang des elektrischen Feldes als Modelldarstellung. Eine Depolarisation öffnet den Kanal in Auswärtsrichtung (rote Pfeile) und eine Umkehr der Ionenflussrichtung (schwarze Pfeile) inaktiviert den regulierenden Filter, ähnlich einem Klappenventil-Mechanismus. Kanalaktivierung via Applikation von Arachidonsäure oder Erniedrigung des intrazellulären pH-Wertes hebt diese Rektifizierung auf und der Spannungsverlauf wird linear [Schewe et al.,2016].



**Abbildung 6:** Spannungsregulierung von  $K_{2P}$ -Kanälen über Ionenflussmechanismus im Selektivitätsfilter, modifiziert aus Schewe et al.,2016. **A:**  $K_{2P}$ -Auswärtsrektifizierung aufgrund der elektrochemischen Triebkraft  $\Delta\mu$  ( $\Delta\mu = V - E_{rev}$ , mit gemessenem Potential  $V$  und Umkehrkehrpotential  $E_{rev}$ ), positive  $\Delta\mu$ -Werte führen zur Aktivierung und negative zur Inaktivierung des Kanals. **B:** Proteinstruktur des TRAAK-Kanals im leitenden Zustand (PDB-ID: 4WFE [Browhan et al.,2012]) mit vier Kaliumionen an den Bindungsstellen S1 bis S4 des Selektivitätsfilters (SF) **C:** Modellvorstellung des Ionenflussmechanismus entlang des elektrischen Feldes des SF, bei der negative  $\Delta\mu$  einen inaktiven und ionenentleerten Zustand des SF hervorrufen. Durch eine Depolarisation (mit positiven  $\Delta\mu$ ) besetzen 3 bis 4 Kaliumionen die leeren SF-Bindungsstellen S1 bis S4 und induzieren eine Konformationsänderung, welche schnell in einen auswärts leitenden Zustand des Kanales übergeht. Eine Umkehr der elektrochemischen Triebkraft (negative  $\Delta\mu$ , Hyperpolarisation) bewirkt nun einen kurzen Einstrom von Kalium bevor dieser instabile Zustand erneut in den ionenentleerten und inaktiven SF übergeht. **D:** Modelldarstellung des Ionenflussmechanismus entlang des elektrischen Feldes. Depolarisation öffnet den Kanal in Auswärtsrichtung (rote Pfeile) und Hyperpolarisation (schwarze Pfeile) inaktiviert den SF, ähnlich einem Klappenventil-Mechanismus.

$K_{2P}$ -Kanäle zeigen im Allgemeinen Sensitivität gegenüber intra- oder extrazellulären pH-Veränderungen ( $pH_e$  /  $pH_i$ ), wobei die Effekte auf die 15 Mitglieder stark variieren. Mit 78 % Sequenzhomologie weisen TREK1 und TREK2 den höchsten Verwandtschaftsgrad unter den  $K_{2P}$ -Kanälen auf. Wenn sich ihre elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften auch sehr gleichen, gibt es doch Unterschiede. Extrazelluläre Erhöhung der Protonenkonzentration im physiologischen pH-Bereich zwischen 6.8 bis 8.4 inhibiert den TREK1- und aktiviert den TREK2-Kanal [Sandoz et al.,2009]. Sensor der Protonenkonzentration ist hier ein dem P1-Segment vorangehendes und TREK/TRAAK konserviertes Histidin (TREK1-H141, Abbildung 5, rosa). Nach Protonierung des TREK1 interagiert es mit zwei negativ geladenen Seitenketten der P2-M4-Schleife (D278<sup>-</sup> und E280<sup>-</sup>) und verursacht einen elektrostatisch bedingten Kollaps der Proteinstruktur, assoziiert mit einer Inhibition vergleichbar der C-Type-Inaktivierung von  $K_V$ -Kanälen [Baukrowitz & Yellen,1995; Cohen et al.,2008]. Im TREK2-Kanal führt hingegen die entsprechende Histidin-Interaktion mit einer positiv geladenen M2-M4-Arginin-Seitenkette zu einer Aktivierung des Ionenkanals. Der TREK1-analoge, inhibitorische  $pH_e$ -Effekt auf TRAAK-Kanäle, mit Aspartat (D<sup>-</sup>) lokalisiert in der M2-M4-Schleife [Sandoz et al.,2009], unterstützt die Theorie der  $pH_e$ -Regulation des Selektivitätsfilters der TREK/TRAAK-Subfamilie über ionische Histidin-Interaktionen. In diesem Falle, sowie unter Verwendung von Rubidium statt Kalium als permeierendem Ion oder filternahen Mutationen werden direkte Aktivierungen des Selektivitätsfilters postuliert. Hierbei wird die Konformation des gesenkten Zustandes kaum verändert, aber ein leitender Zustand des Kanals eingenommen. Somit existieren diese Kanäle nicht nur in den bereits beschriebenen gesenkten und gehobenen Konformationen, vielmehr sind verschiedene leitende Zustände ineinander umwandelbar [McClenaghan et al.,2016].

Der 110 Aminosäuren umfassende C-Terminus des TREK1-Kanals trägt, wie auch die C-Termini des TREK2- oder TRAAK-Kanals, eine Reihe von Bindungsstellen und sensorischen Regionen, welche bereits eingehend untersucht wurden. G-Proteine können sowohl direkt auf den Kanal wirken (N-Terminus, [Woo et al.,2012]), als auch Signalkaskaden auslösen und so die Übertragung von Phosphatgruppen auf Serine des C-Terminus induzieren. Im zweiten Fall ist auch eine Beteiligung von Ankerproteinen (AKAP) möglich [Sandoz et al.,2006]. Phosphorylierungen durch die Proteinkinasen (PK) A und C an den Serinen S348 [Patel et al.,1998] und S315 [Murbartían et al.,2005] stören die Membraninteraktion des proximalen C-Terminus und erniedrigen so die Kanalaktivität. Die Übertragung einer Phosphatgruppe auf das S366 durch PKG resultiert hingegen in einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit [Koh et al.,2001].

Die Aktivierung durch Lipide oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA, 'polyunsaturated fatty acids'), wie Arachidonsäure werden ebenfalls C-terminalen Interaktionen zugeschrieben [Patel et al.,1998; Kim et al.2001a; 2001b Honoré et al.,2002]. Wobei deren Einbettung in die Membran die Oberflächenkurvatur verändert und so primär zur Mechanoaktivierung der Kanäle führt [Maingret et al.,2000a; Chemin et al.,2005a; 2005b; 2007]. Diesbezüglich wurde anhand von Kristallstrukturdaten postuliert, dass Membranlipidketten in die Fenestrierungen der Kanäle eindringen und so den Permeationsweg versperren können [Miller & Long,2012; Nilius & Honoré,2012]. In die Membran insertierte Phospholipide, wie PIP<sub>2</sub>, interagieren dagegen mit C-terminalen Argininen, welche nach Hydrolyse der Phospholipide von der Membran gelöst werden und so zu einem Übergang in die gesenkte Kanalkonformation führen [Souissa et al.,2018].

Die Bindungsstellen für chemische Aktivatoren sind vielfältig und ubiquitär über die Kanalstruktur verteilt. Dong et al. [2015] zeigten die Bindung des Fluoxetin-Metaboliten, Norfluoxetin (NFX) tief in der seitlichen Membranfenestrierung (Abbildung 4) des TREK2-Kanals. Diese Fenestrierung wurde später durch die AG Baukrowitz als pharmakologische Bindungstasche für negativ geladene Aktivatoren indentifiziert, welche sowohl in  $K_{2P}$ -, als auch in  $K_V$  und  $K_{Ca}$ -Kanälen vorhanden sein kann [Schewe et al.,2019]. Das TREK/TRAAK-aktivierende 2-APB (2-Aminoethoxydiphenyl borate), ein zur Charakterisierung von Ionenkanälen vielfach genutztes Substrat, bindet wiederum am distalen C-Terminus [Beltrán et al.,2013; Zhuo et al.,2015]. Überdies werden Regionen des C-Terminus mit der Modulation durch flüchtige Anästhetika, wie Chloroform [Patel et al.,1999] und Wärme [Maingret et al.,2000b] assoziiert.

Intrazelluläre Azidose senkt zwar die Einzelkanalleitfähigkeit des TREK1-Kanals, die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle wird jedoch drastisch erhöht, sodass eine mehr als hundertfache Steigerung der Kanalaktivität die Folge ist [Maingret et al.,1999b]. Diese azide Aktivierung, sowie die vergleichbare  $pH_i$ -Regulation des TREK2- und die Stimulation des TRAAK-Kanals durch alkalischen  $pH_i$ , werden dem sensorischen C-Terminus der Subfamilie zugeschrieben [Maingret et al.,1999b; Kim et al.,2001a]. Trunkierung und Einzelmutagenese C-terminaler Aminosäuren des TREK1-Kanals enthüllten ein proximales, sensorisches Glutamat-Bündel (E320-E324). Diese Region ist mit Regulatoren wie Arachidonsäure,  $PIP_2$  (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate), sowie der Mechanosensitivität assoziiert und beinhaltet den Protonensensor E321<sup>-</sup> im Zentrum [Honoré et al.,2002; Chemin et al.,2005b]. Zudem wird dem Lysin, welches dem Glutamat-Bündel vorgelagert ist, eine potentielle Beteiligung an der intrazellulären pH-Aktivierung zugeschrieben (Woo et al.,2018).

Die Übertragung C-terminaler Signale auf den regulierenden Selektivitätsfilter ist bisher nicht im Detail aufgeklärt und soll im Rahmen dieser Arbeit mit dem Fokus auf die intrazelluläre pH-Aktivierung am sensorischen C-Terminus des TREK1-Kanals untersucht werden. Eine allosterische Signaltransduktion über Bewegungen des M4-Segmentes, induziert durch veränderte C-terminale Membraninteraktionen ist dabei eine weit verbreitete Annahme [Chemin et al.,2005b; Bagriantsev et al,2011; 2012; Lolicato et al.,2014, Dong et al.,2015, Zhuo et al.,2016].

Die Veröffentlichung von TREK2-Kristallstrukturen in gesenkter ('down') und gehobener ('up') Helixkonformation durch Dong et al. (PDB-ID: 4XDJ 'down' und 4BW5 'up', [Dong et al.,2015]), bestätigte die angenommene, ausladende Aufwärtsbewegung des M4-Segmentes beim Übergang in einen gehobenen Zustand der intrazellulären Porensegmente. Die Membranfenestrierung ist dabei nur in gesenkter Helixkonformation zugänglich und in gehobener Segmentausrichtung geschlossen. Die Filterbesetzung der Kristallstrukturen (3  $K^+$  im gesenkten und 4  $K^+$  im gehobenen Zustand), sowie elektrophysiologische Experimente bei C-terminaler Aktivierung des TREK2 durch Arachidonsäure und mechanischen Stress, weisen auf einen  $K^+$ -leitenden Zustand in gehobener Konformation der TREK2-Helices hin [Dong et al.,2015].

Zhuo et al. zeigten den Einfluss der Aktivierung des proximalen C-Terminus auf den Selektivitätsfilter des TREK2-Kanals [Zhuo et al.,2016]. Alanin-Mutation eines TREK/TRAAK spezifischen Phenylalanins ( $\triangleright$  TREK1-F300) führte dort zu einer gehinderten Signalweiterleitung auf den regulierenden Selektivitätsfilter. Ebenso wie die Substitution des in allen  $K^+$ -Kanälen konservierten Gelenk-Glycins ( $\triangleright$  TREK1-G296, Abbildung 5), welches als Drehgelenk der M4-Rotationsbewegungen während des Gatings fungiert [Jiang, Y. et al.,2002; Magidovich und Yifrach,2004; Brohawn et al.,2012].

## 1.4 Physiologische Relevanz der pH-Aktivierung des TREK1-Kanals

Bei der Betrachtung lebender Zellen ist die Berücksichtigung des Anteils der Wasserstoffionen im wässrigen Cytoplasma unabdingbar. Intrazelluläre pH-Veränderungen ( $\Delta\text{pH}_i \approx 0.1 - 1.6$ ) spielen eine Schlüsselrolle bei der metabolischen Regulation und Zellentwicklung. Sie beeinflussen unter anderem die enzymatische Aktivität, den  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt, sowie den cAMP-Spiegel [Busa & Nuccitelli, 1984; Busa, 1986]. Intrazelluläre pH-Veränderungen sind zudem ein wichtiger Modulator der Erregung und Kontraktion von Herzzellen, sowie ein Auslöser kardialer, elektrischer Störungen [Vaughan-Jones et al., 2009]. Eine kardiale Ischämie führt über metabolische Veränderungen zu Herzarrhythmien und ist mit einer Erniedrigung des intrazellulären pH-Wertes assoziiert. Patienten mit kardialen Arrhythmien wie Vorhofflimmern oder Herzfehlern zeigen eine verminderte Expression des TREK1-Kanals in Atrien und Ventrikeln. Zusammen mit der Sensitivität des TREK-Kanals für diverse Klasse I Antiarrhythmika zeigt sich ein Beitrag des TREK1-Kanals zu pathologischen Phänomenen des Herzens [Schmidt et al., 2013; Schmidt et al., 2017; Decher et al., 2017].

Chesler und Kaila berichteten von der intrazellulären Alkalisierung ( $\Delta\text{pH}_i \approx 0.8$ ) von Gliazellen durch Depolarisation [Chesler & Kraig, 1989; Chesler & Kaila, 1992]. Andere Forschungen zeigten Azidifizierung von Neuronen durch Neurotransmitter, wie NMDA (N-methyl-D-aspartat) oder GABA (Gamma-Aminobuttersäure) [Endres et al., 1986; Voipio et al., 1991, Lesage & Barhain, 2011]. Solche Veränderungen des pH-Wertes, wenn zuweilen auch nur an der Membran lokalisiert, können durch die hohe Sensitivität des TREK1-Kanals für intrazelluläre Protonen zu einer Kanal-Aktivierung führen. TREK1-Kanäle sind in humanen Nervenzellen ubiquitär nachweisbar, mit der höchsten Kanaldichte im Rückenmark, Riechkolben, Hippocampus, Cerebellum, Amygdala, Thalamus, Hypothalamus, Basalganglien und im fetalen Hirn [Fink et al., 1996, Hervieu et al., 2001; Medhurst et al., 2001; Talley et al., 2001]. Die allgemein weite Verteilung der TREK/TRAAK-Subfamilie in den Komponenten des zentralen und peripheren Nervensystems weist auf eine essentielle Rolle dieser Kanäle zur Regulierung des Membranpotentials erregbarer Zellen hin.

Die vielfach stimulierbaren  $\text{K}_2\text{P}$ -Kanäle sind erst seit 25 Jahren im Blickpunkt der physiologischen Forschung und seither zu Recht im Fokus des Interesses. Sie verfügen über eine einzigartige Kappenstruktur, welche sie vor extrazellulären Agonisten abschirmen kann. Bemerkenswert ist vor allem ihre ubiquitäre Verteilung innerhalb von Nerven und Gewebezellen. Die Forschungen der letzten zwanzig Jahre ermöglichten die Assoziation des Kanals mit diversen physiologischen Funktionen und pathologischen Prozessen, wie Epilepsie, Schmerz, Depression, Vasodilatation, Neuroprotektion, Nozizeption und Schlaf [Honoré, 2007; Enyedi & Czirjak, 2010; Bista et al., 2012; Steinberg et al., 2015]. So wird etwa der neuronalen Hyperpolarisation nach Aktivierung des TREK-Kanals durch flüchtige Anästhetika, wie Halothan, eine wichtige funktionelle Rolle in der Anästhesie zugeschrieben [Patel et al., 1999; Patel & Honoré, 2001].

Die breite Gewebeverteilung und die polymodale Regulation, wie etwa durch pH, Lipide, chemische Substrate, G-Proteine, Druck, Temperatur oder flüchtige Anästhetika ([Mathie et al., 2010; Feliciangeli et al., 2015]), prädestinieren den TREK1-Kanal als pharmakologisches Zielprotein. Die stärkste Expression des TREK1-Kanals detektierten Fink et al. [1996] im Gehirn und der Lunge von adulten Mäusen, wohingegen die Verteilung in Nieren, Herz und Skelettmuskeln weniger ausgeprägt war. Eine Analyse der humanen Verteilung des TREK1-Kanals zeigte zudem starke Signale in Magen und Dünndarm [Medhurst et al., 2001].

## 1.5 Forschungsansatz und Fragestellung

Die Aktivierung durch mechanischen Stress ( $\Delta p$ ), mehrfach-ungesättigte Fettsäuren, wie Arachidonsäure und intrazelluläre Azidose sind alle C-terminal assoziiert und zeigen nach Honoré et al. am TREK1-Wild-Typ-Kanal vergleichbares Aktivierungspotential. Bei Betrachtung einer Alanin-substituierten Mutation des  $\text{pH}_i$ -sensorischen TREK1-E321<sup>-</sup>, blieb eine Veränderung der Stromstärke durch alle genannten Stimuli aus [Honoré et al.,2002]. Die Untersuchung dieser Kanäle zeigte stets stark gesteigerte Basalströme gegenüber dem Wild-Typ-Kanal, wobei  $\text{pH}_i$  5 sogar in einer Inhibition des stark erhöhten Grundstromes resultierte. Dieses Ergebnis war vermutlich einer direkten Blockade der Pore durch Protonierung geschuldet [Chen et al.,1996; Starkus et al.,2003; Khan et al.,2006; Van Slyke,2012].

Alanin-substituierte und TREK1-Wild-Typ-Kanäle wurden von Honoré et al. durch Arachidonsäure vollständig aktiviert und so die basale Offenwahrscheinlichkeit ( $P_o$ , 'open probability') relativ zum maximal aktivierbaren Strom (10  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure) bestimmt. Austausch von TREK1-E321<sup>-</sup> gegen die Aminosäuren Cystein oder Lysin erhöhte den Basalstrom analog, wohingegen die Glutamat-Substitution gegen das ebenfalls negativ geladene Aspartat, die sensorische Funktion mit Wild-Typ-ähnlicher Offenwahrscheinlichkeit erhalten konnte [Honoré et al.,2002]. Einige Alanin-Substitutionen im proximalen C-Terminus und im Aufgang des M4-Segmentes zeigten bereits weitere Positionen erhöhter Offenwahrscheinlichkeit [Honoré et al.,2002; Woo et al.,2018]. Die membranorientierte, helicale Anordnung deutet dabei auf eine mögliche Membraninteraktion dieser Seitenketten zur Signaltransduktion auf die Filterregion des TREK1-Kanals.

### Fragestellung:

Unter Beteiligung welcher Seitenketten der TREK1-Porensegmente wird das C-terminale Signal übertragen? Wie erfolgt die Transduktion auf den regulierenden Selektivitätsfilter? Und welche strukturellen Veränderungen gehen mit einer  $\text{pH}_i$ -Aktivierung einher?

Zur Aufklärung der intrazellulären Regulation des TREK1-Kanals sollen nun zunächst pH-Gating relevante Aminosäuren mittels Cystein-Mutagenese identifiziert werden. Die Segmentbewegungen während einer  $\text{pH}_i$ -Aktivierung sollen anschließend durch Prüfung der Zugänglichkeit der 82 untersuchten Porenmutationen analysiert werden. MTS-Modifikationen identifizieren hierbei frei liegende Cystein-Seitenketten in inaktivem ( $\text{pH}_i$  8) und aktivem Zustand ( $\text{pH}_i$  5) des TREK1-Kanals (SCAM-Methode, siehe Methoden und Auswertung).



## 2 Methoden und Auswertung

Zur Identifikation von pH-Gating relevanten Aminosäuren der TREK1-Pore wurden elektrophysiologische (Patch-Clamp, inside-out) und molekularbiologische Methoden (Cystein-Punktmutationen, mittels QuikChange-Technik) angewendet. Die Untersuchung auf Zugänglichkeit der intrazellulären Aminosäure-Seitenketten, unter Bewegung der Porensegmente des TREK1-Kanals, erfolgte durch Modifikation der Cystein-substituierten Einzelmutationen in inaktivem (pH<sub>i</sub> 8) und aktivem Zustand (pH<sub>i</sub> 5) des Kanals (SCAM) in Patch-Clamp Experimenten.

### 2.1 Die Patch-Clamp-Technik

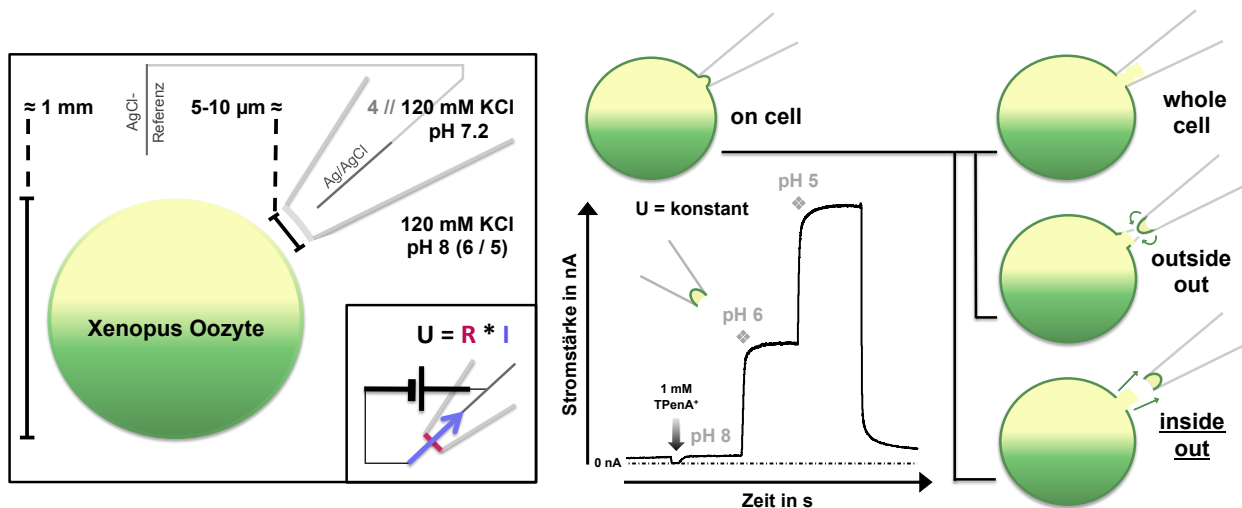
Die in der experimentellen Elektrophysiologie weitverbreitete Patch-Clamp-Technik basiert auf der 1952 [Hogd-kin, Huxley & Katz] erstmals beschriebenen Voltage-Clamp-Technik ('voltage clamp': Spannungsklemme) mit der Hogd-kin und Huxley elektrisch erregbare Membranströme an Tintenfischaxonen detektieren und charakterisieren konnten [Hogd-kin & Huxley,1952a-d]. Die physiologische Bedeutung der Zellerregung zur internen Kommunikation bei Gewebetieren führte seither zu großen Entwicklungen auf dem Gebiet der Elektrophysio-logie und 1976 zur revolutionären Weiterentwicklung der Voltage-Clamp- zur Patch-Clamp-Technik [Neher & Sakmann,1976]. Diese Methode ermöglicht die Ableitung von Membranströmen in definierten Membranaus-schnitten ('patch') oder über eine vollständige Zelle, ohne kapazitative Störungen und bei nahezu konstantem elektrochemischem Gradienten. Gemessen wird dabei das Membranpotential, dessen Spannungsänderungen über einen applizierten Strom ('Klemm'-strom) kompensiert werden und das Membranpotential somit konstant gehalten (geklemmt) wird. Dieser Kompensationsstrom ist nun direkt proportional zum Ionenstrom über die Membran und kann mittels eines Messprogrammes instantan angezeigt und analysiert werden. Ein optimier-ter Aufbau dieser Technik ermöglicht die störungsfreie Untersuchung sehr geringer Stromamplituden, so dass die Messung einzelner Ionenkanäle mit Leitfähigkeiten von wenigen Picosiemens möglich wird [Blatz & Mag-leby,1986; Park,1994]. Die Grundlage dieser Dissertation bilden makroskopische Ströme über eine große Zahl von Ionenkanälen mit Stromgrößen von einigen Nanoampere (nA). Detaillierte Angaben zu Aufbau und prakti-schem Vorgehen finden sich im Abschnitt 2.4.

Als Expressionssystem zur Einbringung und Untersuchung von Membranproteinen haben sich die vielseitigen Eizellen (Oozyten) des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus leavis* oder *borealis* schon seit langem etabliert. Besonders die geringe Anzahl endogener Ionen transportsysteme prädestiniert die Plasmamembran dieser Oo-zyten für die Untersuchung von Ionenkanälen. Im Membranpatch fließen über die native Oozytenmembran nur sehr kleine Ionenströme, wobei der dominante Calcium aktivierte Chloridkanal durch den Zusatz von extrazel-lulärem EGTA, einem Ca<sup>2+</sup>-Chelatbildender, unterdrückt werden kann [Barish,1983].

Die Froschhaltung, Oozytengewinnung und deren Präparation sind verhältnismäßig leicht handhabbar. Zudem können die präparierten Eizellen bis zu etwa zehn Tagen aufbewahrt und die Membran für Experimente verwen-det werden. Die große Anzahl von gebundenen (Endoplasmatisches Reticulum) und freien Ribosomen sorgen in Oozyten für eine hohe und andauernde Translationseffizienz [Gurdon et al.,1971]. Der korrekte Einbau struktur-veränderter oder komplexer Proteine in die Plasmamembran wird in *Xenopus Oozyten* durch eine hohe Anzahl posttranslationaler Modifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierung oder Entfernung von Polypeptidketten, katalysiert [Colman et al.,1984].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem die RNA des  $K_{2P}$ -Kanals rTREK1-Wild Typ (TREK1-WT der Ratte, GenBank-Kennnummer: NM\_172042.2) in Oozyten zur Expression gebracht und mittels Patch-Clamp-Technik untersucht. Das grundlegende Messprinzip zeigt Abbildung 7.

Die maximale Expression zeigen Oozyten von *Xenopus laevis* im Reifestadium IV-V [Dumont,1972]. Ihr Durchmesser beträgt dann zwischen 1 und 1.2 mm und sie zeigen eine hemisphärische, dunkle Pigmentierung der Membranoberfläche (Abbildung 7). Nach der Präparation der Oozyten und Expression der Kanalproteine (siehe Abschnitt 2.3) wird zur Messung der Membranströme eine abgerundete Borosilicatglas-Pipette (Patch-Pipette, 5-10  $\mu\text{M}$  Durchmesser), welche eine Ag/AgCl-Messelektrode enthält, auf der Oozytenoberfläche platziert. Anlegen von Unterdruck erzeugt einen Sog auf die Plasmamembran innerhalb des Öffnungsradius der Patch-Pipette. Der Widerstand innerhalb der Pipettenöffnung steigt, bis die Öffnung bei Messung mehrerer Gigaohm ( $\text{G}\Omega$ ) abgedichtet ist ('Gigaseal'). Über das Ohm'sche Gesetz kann nun bei gegebenem Patchwiderstand ( $R$ , Abbildung 7, rot) über die Änderungen der Membranspannung ( $U$ , Abbildung 7, rot) über die Änderungen der Membranspannung ( $U$ ) zu einer Referenzelektrode, die entsprechende Stromstärke ( $I$ , Abbildung 7, blau) umgehend berechnet und dargestellt werden.



**Abbildung 7:** Prinzip und Rahmenbedingung der Patch-Clamp-Experimente an der *Xenopus Oozyte*. Nach Bestimmung des Pipettenwiderstandes ( $R$ , rot) und anlegen einer Spannung ( $U$ , schwarz) zwischen Ag/AgCl-Mess- und Referenzelektrode (AgCl) kann die gemessene Stromstärke über die Membran ( $I$ , violett) mittels des Ohm'schen Gesetzes berechnet werden (links). Mögliche Messkonfigurationen des Patch-Clamp (rechts): 'on-cell', 'whole-cell', 'outside-out', sowie die hier verwendete 'inside-out'-Variante mit exemplarischer Stromantwort (nA) des TREK1-Kanals unter Wechsel des intrazellulären pH-Wertes ( $\Delta\text{pH}_i$ ) über die Zeit (s). In dieser Konfiguration entspricht der extrazelluläre pH-Wert dem der Pipettenlösung und lag stets unverändert bei 7.2 (rechts). Die  $\text{K}^+$ -Bedingungen in der Pipettenlösung und der Messlösung (intrazelluläres Medium) waren innen und außen symmetrisch auf je 120 mM  $\text{K}^+$  eingestellt.

Die Stromantwort der Oozytenmembran kann in verschiedenen Konfigurationen gemessen werden, Abbildung 7 (rechts) zeigt die vier Varianten. Nach der Formierung des Gigaseals ist der Patch noch intakt mit der Zelle verbunden, dieser Modus wird 'on-cell' genannt und stellt den Ausgangsmodus der möglichen Konfigurationen dar. Starker Unterdruck auf die Pipette reißt die Patchmembran aus der Pipettenöffnung und die Pipettenlösung tritt in Kontakt mit dem Cytoplasma der Oozyte. In dieser 'whole-cell'-Konfiguration kann der Strom über die gesamte Eizelle abgeleitet werden. Zug an der Pipette im 'on-cell'-Modus dehnt die fixierte Membran bis zum Reißen.

Spontan formen sich Membranpatche im 'outside-out'-Modus, welche die Untersuchung der Membranaußenseite im exidierten Patch erlauben. Die 'inside-out'-Konfiguration eröffnet die Möglichkeit, die cytoplasmatische Seite der Zellmembranen offen zu legen. Ausgehend vom 'on-cell'-Gigaseal wird die Patch-Pipette ruckartig von der Oozyte weggezogen und so der Patch mit der Innenseite nach außen aus der Plasmamembran entrissen. Zur Analyse intrazellulärer Vorgänge ist die 'inside-out'-Patch-Clamp-Technik weitverbreitet und auch im Rahmen aller Experimente dieser Dissertation zur Anwendung gekommen. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Messungen bei Raumtemperatur, einer kontinuierlichen Membranspannung von -80 mV und unter symmetrischen Kaliumbedingungen mit je 120 mM K<sup>+</sup> innen und außen durchgeführt. Vollständige Angaben zu den verwendeten Lösungen und Geräten finden sich im Anhang (Abschnitt 5.1 - 5.4).

Die dargestellte Beispielmessung (Abbildung 7, rechts) zeigt die Stromantwort von TREK1-Kanälen auf den Wechsel des pH-Wertes von 8 auf 6 und 5, in der 'inside-out'-Konfiguration bei einer konstanten Membranspannung von -80 mV. Eine Erhöhung der intrazellulären Protonenkonzentration aktiviert den Kanal nahezu instantan und steigert so den Stromfluss über die Membran. Der zügige Wechsel der Messlösungen wird durch die Verwendung eines mehrgängigen Applikationssystems und einer dreidimensional beweglichen Patch-Pipette möglich (Abschnitt 2.4, Abbildung 11). Kanalreaktionen auf Lösungswechsel können so unverzüglich beobachtet werden. Die instantane und vollständige Inhibition des TREK-Stroms durch 1 mM TetraPentylAmmonium ist in Abbildung 7 (TPenA<sup>+</sup>, Blockpfeil) gezeigt. Ihr liegt ein Porenblock des TREK-Kanals durch TPenA<sup>+</sup> zugrunde und dient zur Abgrenzung des Kanalstromes von Hintergrundströmen [Piechotta et al.,2011].

Die Änderung der Membranspannung durch Stimulation des Ionenkanals wird vom Messsystem kompensiert und im Falle des TREK1-Kanals auf dem voreingestellten Ruhemembranpotential bei -80 mV gehalten. Die hierzu nötige Kompensationsspannung wird in die Stromstärke übersetzt, über die Zeit detektiert und ist wie folgt beschreibbar:

$$\text{Stromstärke } I \text{ (nA)} = N * \sigma * P_o \quad (1)$$

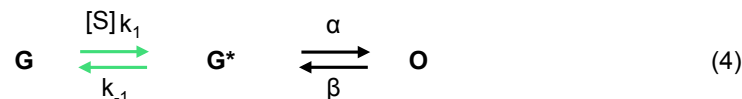
mit **N** = Gesamtanzahl messbarer Ionenkanäle  
 **$\sigma$**  = Leitfähigkeit des Einzelkanals  
 **$P_o$**  = Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle

Die gemessene Stromstärke  $I$  ergibt sich demnach aus den Leitfähigkeiten der Einzelkanäle ( $\sigma$ ), multipliziert mit ihrer Gesamtanzahl ( $N$ ) in der Membran. Da es sich um regulierbare Proteine handelt, welche einen leitenden oder nicht-leitenden Zustand einnehmen können, ist das Einbringen eines Wahrscheinlichkeitsfaktors für den Proteinzustand unabdingbar.  $P_o$  spiegelt diesen Faktor wieder und wird als Offenwahrscheinlichkeit des Kanals bezeichnet. Da im Rahmen dieser Arbeit keine Einzelkanalmessungen durchgeführt wurden und die exakte Anzahl der Kanäle im gemessenen Membranpatch nicht bekannt ist, ist hier die relative Offenwahrscheinlichkeit zu verwenden. Diese spiegelt die Aktivität der Kanäle wieder und ergibt sich aus dem Verhältnis von gemessener zur maximaler Stromantwort, wenn die Kanalanzahl und -leitfähigkeit als konstant angesehen wird.

$$\text{rel. } P_o = \frac{P_o}{P_{o, \max}} = \frac{I}{I_{\max}} \quad \text{mit } N, \sigma \approx \text{konstant} \quad (2)$$

## 2.2 Bestimmung des EC<sub>50</sub>-Wertes der pH-Aktivierung von TREK-Kanälen

Ionenkanäle können durch Bindung einer Vielzahl von Molekülen moduliert werden. Die entsprechenden Moleküle interagieren mit ihren spezifischen Bindungsstellen im Protein und beeinflussen so die Kanalstruktur. Der Ionenkanal wird durch die Bindung eines Liganden nicht direkt geöffnet, wie es in der Zustandsgleichung (2) der Falle wäre. Stattdessen wird zunächst, ausgehend vom geschlossenen Kanal (Gleichung 3, G = Geschlossen), ein quasistationärer Übergangszustand (G\*) des Proteins eingenommen, welcher dann in die leitende Konformation des Kanal-Liganden-Komplexes übergeht (Gleichung 3, O = Offen). Dieser Übergang ist unabhängig von der Konzentration freien Liganden ([L]) und, wie die vorherige Protein-Liganden-Bindung, reversibel. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist hierbei die Protein-Liganden-Bindung, somit kann die schnelle Konformationsänderung in der Betrachtung vernachlässigt werden [Atkins,1996].



mit  $\frac{[S]k_1}{k_{-1}} = K_D = \text{Dissoziationskonstante}$   
 $[S] = \text{Substratkonzentration}$   
 $k = \text{Geschwindigkeitskonstanten der}$   
 (1) Hin- und (-1) Rückreaktion ( $\alpha, \beta$ : Analog)

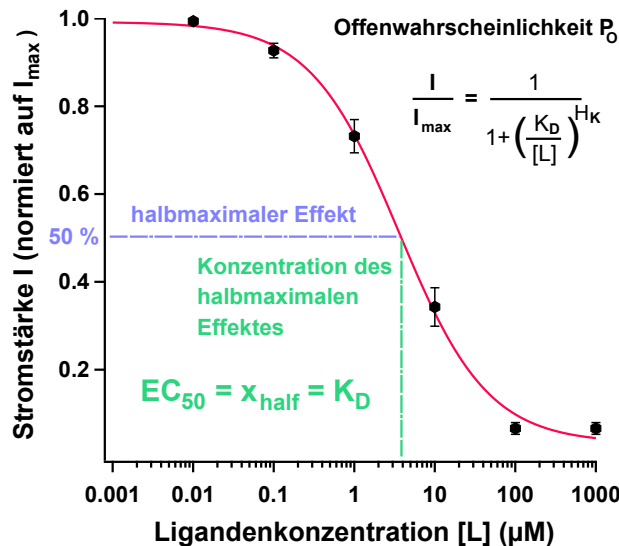
Für die Betrachtung der relativen Offenwahrscheinlichkeit (rel.  $P_O$ ) des Ionenkanals kann hier demnach von einem Zwei-Zustandssystem ausgegangen werden, dessen Zustandsbesetzung einer Boltzmann-Verteilung folgt.

$$\text{relative Offenwahrscheinlichkeit: } \text{rel. } P_O \Rightarrow \frac{n_o}{N} = e^{-E_a/RT} \quad (5)$$

mit  $n_o = \text{Anzahl offener Kanäle}$   
 $N = \text{Gesamtanzahl der Kanäle}$   
 $E_a = \text{Aktivierungsenergie}$   
 $R = \text{universelle Gaskonstante}$   
 $T = \text{Temperatur}$

Die relative Offenwahrscheinlichkeit ist demnach definiert als der Anteil der geöffneten Ionenkanäle ( $n_o$ ) relativ zu ihrer Gesamtanzahl ( $N$ ) und ist abhängig von der Temperatur ( $T$ ) und der nötigen Aktivierungsenergie  $E_A$  des Kanals. Die Anwendung der Boltzmann-Verteilungsfunktion für ein Protein-Liganden-System führt zur Hill-Gleichung, dargestellt in Abbildung 8 (rechts, oben). Nach vollständiger Absättigung der Bindungsstellen durch den applizierten Liganden wird ein stabiler Endzustand eingenommen. Aus einem solchen Protein-Liganden-System ergibt sich nach Auftragung der vollständig gesättigten Konzentrations-Wirkungskurve und Anwendung der Hill-Gleichung der spezifische Parameter der Konzentration des halbmaximalen Effektes (EC<sub>50</sub>) [Hille,2001]. Abbildung 8 zeigt dies am Beispiel der Norfluoxetin-(NFX)-Inhibition (bis 1 mM) am TREK2-Kanal.

Die mit der Ligandenkonzentration ( $[L]$ ) variierende Stromgröße wird auf den höchsten Stromwert normiert und beides gegeneinander aufgetragen. Mit Hilfe der Hill-Gleichung (Abbildung 8) kann im Anschluss die Steilheit der Messkurve als Maß für die Anzahl der jeweils nötigen Bindungspartner herangezogen werden ( $H_K$ , Hill-Koeffizient). Die Dissoziationskonstante  $K_D$  ist eine Protein-Liganden-spezifische Konstante und zeigt die Konzentration an, bei welcher dis- und assoziierte Ligandenanteile im Gleichgewicht vorliegen. Diese Konzentration bei halbmaximalem Effekt wird als  $EC_{50}$  ('effective concentration') bezeichnet und dient zur Beurteilung der Bindungsaffinität eines Liganden an das entsprechende Protein. Im Falle des in Abbildung 8 gezeigten Effektes des NFX kann auch von einem  $IC_{50}$  ('inhibitory concentration') gesprochen werden, da der Strom des Kanals durch den Liganden NFX inhibiert und nicht aktiviert wird. Für die Verwendung von Protonen als Liganden der Proteinbindung kann diese Gleichung ebenfalls angewendet werden. Durch den dekadisch logarithmierten Charakter des pH-Wertes kann, bei der Bestimmung der halbmaximal-effektiven Protonenkonzentration  $pH_{50}$ , auf die andernfalls nötige Logarithmierung der Ligandenkonzentration ( $[L]$ , Abbildung 8) verzichtet werden.



**Abbildung 8:** Ermittlung des  $EC_{50}$  und des Hill-Koeffizienten ( $H_K$ ) am Beispiel der Norfluoxetin-(NFX)-Inhibition des TREK2-Kanals. Die Stromstärke normiert auf ihren Maximalwert ( $I/I_{max}$ ) und aufgetragen gegen den dekadischen Logarithmus der Ligandenkonzentration ( $[L]$ ), ergibt die Konzentrations-Wirkungskurve (rot). Mittels Hill-Gleichung (oben rechts) ergibt sich die Konzentration des halbmaximalen Effektes ( $EC_{50}$ , grün) über Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  und der Hillkoeffizient aus der Steilheit des Graphen, als Maß für die Anzahl der benötigten Liganden.

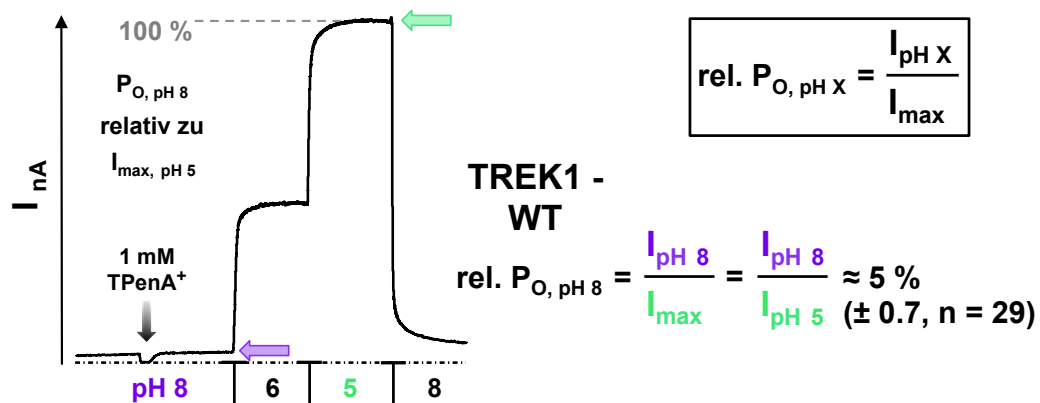
Generell sind alle generierten Daten als arithmetische Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler (STF) angegeben, welche sich durch Gleichung 6 beschreiben lassen und die Anzahl ( $n$ ) der Messungen einbeziehen.

$$STF = \frac{\sqrt{\frac{\sum (x-MW)^2}{n-1}}}{\sqrt{n}} \quad \text{mit} \quad \begin{array}{l} x = \text{Datenpunkt} \\ MW = \text{Mittelwert} \\ n = \text{Anzahl der Experimente} \end{array} \quad (6)$$

### 2.3 Abschätzung der relativen Offenwahrscheinlichkeit

Die Offenwahrscheinlichkeit ( $P_O$ ) von Ionenkanälen ist nur durch Einzelkanalmessungen exakt bestimmbar. Bei der Messung von makroskopischen Strömen über viele Ionenkanäle kann aber auf eine Abschätzung (rel.  $P_O$ , siehe Gleichung 2) zurückgegriffen werden. Hierbei wird die Stromgröße des inaktiven Kanalzustandes ( $I_{pH8}$ ) in Relation zur maximal aktivierbaren Stromgröße ( $I_{pH5}$ ) gesetzt. In Abbildung 9 wird die Beurteilung der Wirkung von Mutationen auf die relative Offenwahrscheinlichkeit von TREK1-Kanälen dargestellt. Das verwendete 3-Punkte-Messprotokoll ist im folgenden beschrieben.

Zur Charakterisierung der 82 Cystein-Kanalmutanten wurde jeweils der inaktive Grundzustand bei pH 8 und die maximale Stromsteigerung durch pH 5 bestimmt und ausgewertet. Zur qualitativen Beurteilung kleiner Effekte wurde zudem stets die Aktivierung bei pH 6 betrachtet, welche einer halb-maximalen Stimulation im TREK1-WT-Kanal entspricht (Abbildung 9).



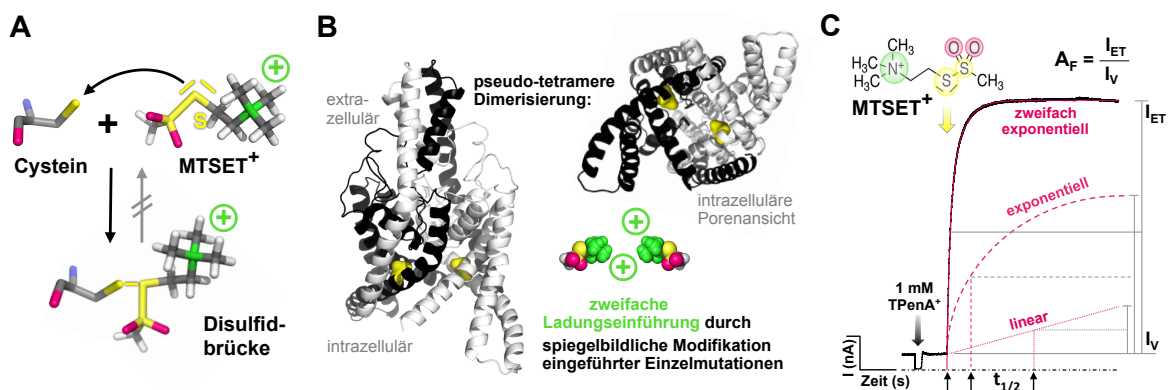
**Abbildung 9:** Auswertung der 3-Punkte-Bestimmungen zur Charakterisierung der 82 Punktmutationen des TREK1-Kanals. Bestimmung der relativen Offenwahrscheinlichkeit (rel.  $P_O$ ) durch Quotientenbildung von Basal- (pH 8) und Maximalstrom (pH 5) am Beispiel des TREK1-WT mit  $5 \pm 0.7\%$  ( $n = 29$ ).

Die Verwendung der Hill-Gleichung zur Analyse der Daten einer 3-Punkte-Bestimmung ist ungeeignet, da sowohl die Steigung der Kurve (Hill-Koeffizient,  $H_K$ ), als auch die effektiven halb-maximalen Protonenkonzentrationen ( $\text{pH}_{50}$ ) stark von der Offenwahrscheinlichkeit der mutierten Kanäle, sowie der Anzahl der Messpunkte abhängig sind (Abbildung 9B). Die Charakterisierung der Mutanten beruht also primär auf der Betrachtung der relativen Offenwahrscheinlichkeit (rel.  $P_O$ ) des Grundzustandes bei  $\text{pH}_i$  8, gegenüber der maximalen Aktivierung durch  $\text{pH}_i$  5 und lässt sich durch einfache Quotientenbildung bestimmen (Abbildung 9C). Im Falle des TREK1-WT-Kanals ergibt sich eine rel.  $P_O$  von  $\approx 5 \pm 0.7\%$  ( $n = 29$ ). Dieser Wert dient als Maß für die Kanalaktivität des Grundzustandes (Grundaktivität) und fortan als Referenz zur Beurteilung der Grundaktivität der systematisch substituierten TREK1-Kanäle.

## 2.4 Chemische Modifikation von Cysteinen zur Untersuchung von Ionenkanälen

Schon 1977 beschrieben Kenyon und Bruice reaktive Sulfhydryle und kategorisierten sie nach ihren vielfältigen Eigenschaften [Kenyon & Bruice, 1977]. Sulfhydryl- oder auch Thiolgruppen haben die allgemeine Form R-SH und bestehen aus einem Thioalkohol (-SH, Thiol) und einem organischen Rest R, dessen Charakter die Eigenschaften der Sulfhydryl-Reagenzien festlegt. Die reaktiven Thiole können, je nach Bindungspartner, reversible oder irreversible Bindungen ausbilden. Enthält der Reaktionspartner ein Schwefelatom mit freien Elektronenpaaren, so bilden sich durch Oxidation kovalente Disulfidbrücken, deren Ionisierungsenergie so hoch ist, dass die Reaktion nur mit Hilfe von starken Reduktionsmitteln reversibel ist.

Akabas et al. [1992] nutzten dies zur Entwicklung von kleinen, reaktiven Methanthiosulfonaten (MTS) mit verschiedenen Eigenschaften, welche irreversibel an die Thiolgruppen von Cystein-Seitenketten binden können. Das negativ geladene Methanthiosulfonat MTSES<sup>-</sup> (2-Sulfonatoethyl-MTS, CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>), wie auch das MTSET<sup>+</sup> (2-(Trimethylammonium)ethyl-MTS, CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>3</sub><sup>+</sup>, Abbildung 10C) mit positiver Ladung, sind mittlerweile sehr gut etabliert und auch in dieser Arbeit zur Überprüfung der Zugänglichkeit eingeführter Cystein-Seitenketten (SCAM, 'Substituted-cysteine-accessibility method') im TREK1-Kanal zur Anwendung gekommen.



**Abbildung 10:** Die irreversible MTSET<sup>+</sup>-Modifikation an Cystein-Seitenketten des TREK-Kanals. **A:** Thiolgruppen freiliegender Cystein-Seitenketten werden durch freie Elektronenpaare reaktiver Thiosulfonate in einer Disulfidverknüpfung irreversibel gebunden. **B:** Markierung einer exemplarischen Einzelmutation im TREK-Strukturmodell in Frontal- und intrazellulärer Porensicht (PDB-ID: 4BW5 [Dong et al., 2015]). Aufgrund der pseudo-tetrameren Dimerbildung von K<sub>2P</sub>-Kanälen werden Einzelmutationen hier stets zweifach und gegenüberliegend in das funktionelle Protein eingeführt. Das hier verwendete Methanthiosulfonat MTSET<sup>+</sup> bringt nach vollständiger Modifikation zwei nahezu spiegelbildlich lokalisierte, positive Ladungen in die Proteinstruktur ein. **C:** Stromantwort einer MTSET<sup>+</sup>-Modifikation als darstellendes Beispiel zur Beurteilung der Modifikationsgeschwindigkeit. Die Modifikationsverläufe können dabei linear, einfach oder zweifach exponentiell sein. Vergleichend wurde daher die absolute Stromveränderung durch MTSET<sup>+</sup> ( $\Delta I = I_{ET} - I_V$  (vor MTSET<sup>+</sup>)) bestimmt und die Zeit nach halbmaximaler Modifikation ( $t_{1/2}$ ) manuell ausgewertet (Pfeile). Die relative Stromveränderung wurde mittels Quotientenbildung aus  $I_{ET}$  und  $I_V$  errechnet, Aktivierungsfaktoren  $A_F > 1$  zeigen eine Stromsteigerung und  $< 1$  eine Inhibition durch MTSET<sup>+</sup>-Bindung.

Bedingt durch den nahezu symmetrischen Aufbau von K<sub>2P</sub>-Kanälen aus zweimal der selben Untereinheit (Abbildung 10B, TREK2-Struktur, schwarz/weiß, PDB-ID: 4BW5 [Dong et al., 2015]), wird die Substitution einer einzelnen Aminosäure zweifach in den dimeren Kanal eingebracht (Abbildung 10B, exemplarische Cystein-Mutation, gelb). Appliziert man ein Thiosulfonat, können entsprechend beide eingeführten Cysteine modifiziert werden.

Das reaktive, positiv geladene Methanthiosulfonat  $\text{MTSET}^+$  wird schnell hydrolysiert und muss bei Raumtemperatur mit einer Halbwertszeit von etwa 11 bis 55 Minuten [Karlin & Abakas,1998] zügig verwendet werden. Um die gewünschte Konzentration applizieren zu können, wurde der weiße Feststoff vor jedem Experiment frisch in Lösung gebracht und innerhalb weniger Minuten verwendet. Durch seine hohe Reaktivität bilden die freien Elektronenpaare des zweifach gebundenen  $\text{MTSET}^+$ -Schwefelatoms, schnell und irreversibel, stabile Disulfidbrücken zu Thiolgruppen frei liegender Cystein-Seitenketten aus (Abbildung 10A). Die Einbringung zweier positiver Ladungen (Abbildung 10B, grün) durch eine  $\text{MTSET}^+$ -Modifikation sorgt für eine Störung der Proteinstruktur. Sie interagieren mit umliegenden Aminosäuren und beeinflussen so die Eigenschaften des Kanals. Der zumeist zweifach exponentielle Kurvenverlauf kann sich je nach Kanalzustand zu einem exponentiellen oder linearen Modifikationsverlauf verändern. Um die Zugänglichkeiten der 82 Cystein-Mutationen im aktiven (pH 5) und inaktiven Zustand (pH 8) vergleichen zu können, wurden zunächst die absoluten Stromveränderungen ( $\Delta I$ ), nach vollständiger  $\text{MTSET}^+$ -Modifikation ( $I_{ET}$ ) in Bezug auf den Ausgangsstrom ( $I_V$ , vor  $\text{MTSET}^+$ ), bestimmt. Ließen sich Stromveränderungen durch die Bindung des  $\text{MTSET}^+$  ermitteln, wurden die Geschwindigkeiten der Modifikationen, über die Zeit des halb-maximalen Effektes ( $t_{1/2}$ ), ausgewertet. Abbildung 10C zeigt das prinzipielle Vorgehen und die zeitlichen Unterschiede im Vergleich von zweifach exponentiellem zu linearem Ratenverlauf (Pfeile).

Der Aktivierungsfaktor  $A_F$  (Abbildung 10C) stellt die relative Veränderung der Stromgröße dar und ergibt sich aus dem Verhältnis des initialen Stromes ( $I_V$ , vor  $\text{MTSET}^+$ ), zum aktivierten Strom ( $I_{ET}$ ) nach der  $\text{MTSET}^+$ -Applikation. Ein  $A_F > 1$  repräsentiert demnach eine Aktivierung,  $A_F < 1$  eine Inhibition des Stromes.

## 2.5 Darstellung der Proteinstrukturen

Alle gezeigten Strukturmodelle wurden mittels der Grafiksoftware PyMOL (DeLano Scientific LLC, Schrödinger) generiert. Die bereits veröffentlichten Kristallstrukturen wurden hierzu aus der RCSB-Proteindatenbank entnommen (PDB-ID) und die fraglichen Bereiche oder einzelne Aminosäure-Seitenketten hervorhebend markiert. Vergleiche der Aminosäuresequenzen wurden mittels CLC-Sequence Viewer 7 (QIAGEN Aarhus A/S) durchgeführt und vereinzelt auch mittels dieser Software dargestellt.

## 2.6 Präparative Methoden

### 2.6.1 Systematische Einführung von Cysteinen durch DNA-Mutagenese

Die Einführung von Punktmutationen in das TREK1-Kanalprotein erfolgte via ortsspezifischer Mutagenese von DNA-Plasmiden ('site-directed mutagenesis' [Hutchison,1978]). Unter Verwendung der 'QuikChange'-Technik wird, mit Hilfe eines im Zentrum mutagen entworfenen Primers, die zirkuläre Plasmid-DNA ('Template') via Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Anschließend werden die parentalen und damit methylierten Plasmide durch DpnI-Restriktionsenzyme verdaut, welche ausschließlich methylierte DNA spaltet. Die mutierte, unmethylierte DNA wird in *E. coli* transformiert, isoliert [Miniprep-Kit, Thermo Scientific] und extern sequenziert. Korrekt mutierte DNA wurde wiederum durch *E. coli* vervielfältigt, isoliert [Midiprep-Kit, Thermo Scientific] und im Anschluss an die Präparation per Gelelektrophorese kontrolliert, sowie die Konzentration photometrisch bei 280 nm (Absorptionsspektroskopie, Nanodrop) bestimmt.



Alle Mutationen im Rahmen dieses Projektes basieren auf dem pBF-Plasmid [Baukowitz et al., 1999] des rTREK1-Kanals (GenBank-Kennnummer: NM\_172042.2), dieses trägt eine Ampicillinresistenz, wodurch nur plasmidtragende Bakterien selektiv kultiviert werden.

### 2.6.2 RNA-Synthese aus DNA-Plasmiden

Als RNA-Synthese-Matrizen dienten im Zuge dieses Projektes Klone des rTREK1-WT-Plasmides (NM\_172042.2) und darauf basierende Mutationen, sowie Klone des hTREK2 (NM\_021161.4) und hTRAAK (AF247042.1). Die verwendeten TREK-Konstrukte der *in-vitro*-Transkription wurden in den pBF-Oozytenvektor (TRAAK: pFAW-Vektor) eingebracht und tragen den bakteriellen T7-RNA-Promotor als Bindungsstelle der RNA-Polymerase. Zur Synthese der RNA wurde das mMESSAGING mMACHINE-Kit (Ambion) bzw. AmpliCap-Kit (Cellscript) verwendet. Die DNA-Basensequenz wird hierbei komplementär in RNA transkribiert und an das 3'-Ende der linearen RNA eine Adenosin-Nukleotid-Kette (Polyadenylierung) angehängt. Die gereinigte RNA wurde per Gelelektrophorese kontrolliert und im Anschluss elektrophysiologisch auf Aktivität getestet. Die Konzentration der generierten RNA-Transkripte wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt und lag in der Regel zwischen 1-2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### 2.6.3 Präparation der Oozyten

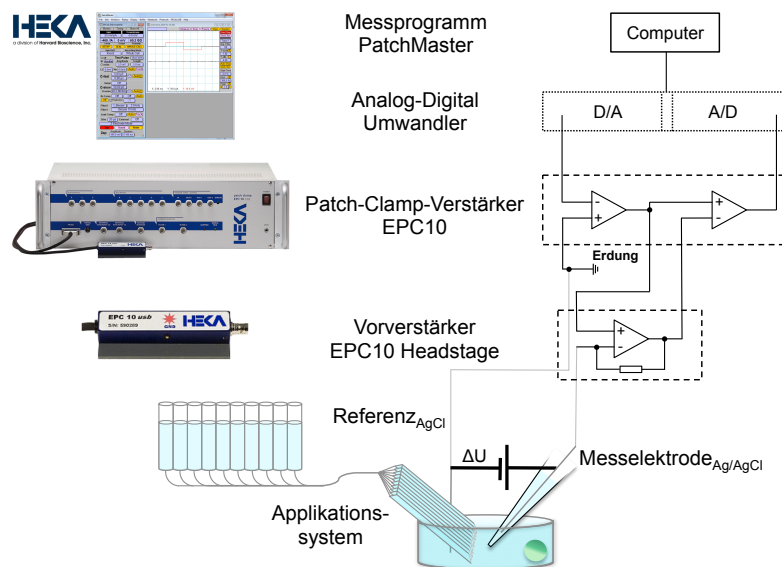
Eizellen des Krallenfrosches der Arten *Xenopus laevis* und *borealis* bieten zahlreiche Vorteile als Expressionssystem für Membranproteine (Abschnitt 2.1, Patch-Clamp-Technik). Einer ist die vergleichsweise einfache Gewinnung und Präparation der Oozyten. Ein Tauchbad in 400 ml einer 5 mM Tricain (Ethyl-3-aminobenzoat-Methansulfonat)-Lösung für 10 bis 15 Minuten sedierte die Frösche für etwa eine Stunde. Die Oozyten wurden in dieser Zeit chirurgisch aus dem oberflächlich an der Bauchwand liegenden Ovarium entnommen und das Ovargewebebündel umgehend in die Waschlösung überführt. Der etwa 1 cm lange Einschnitt in der Bauchdecke wurde vernäht, der Frosch katalogisiert und bis zur nächsten Entnahme mindestens drei Monate geschont. Nach einigen Spülgängen der Oozyten in der Waschlösung und grober mechanischer Vorzerkleinerung des Bindegewebes mittels einer Schere, wurden die Oozyten für etwa 45 Minuten in Collagenase (CLS II, 14400 Units) geschwenkt, um überflüssiges Bindegewebe und Oozyten der Stadien I bis III zu entfernen. Die nun vereinzelt Eizellen konnten nach mehrmaligem Spülen in Inkubationslösung für mehrere Tage aufbewahrt und zur elektrophysiologischen Analyse verwendet werden.

Im Anschluss an die Entfernung der zellversorgenden und reifefördernden Follikelmembran [Dumont & Brummet, 1978] wurden pro Eizelle etwa 0.1  $\mu\text{l}$  RNA über scharf abgeschrägte Glaspipetten (2-5  $\mu\text{m}$  Durchmesser, Borosilicat, Hilgenberg GmbH, Malsfeld) steril injiziert. Mittels eines Pipetten-Ziehgerätes ('Puller', Sutter Instruments, USA) wurden im Vorfeld die nötigen Injektionspipetten aus dünnwandigen Borosilicat-Kapillaren schmal ausgezogen und in Kanülenform scharf abgebrochen. Unter RNase-freien Bedingungen erfolgte dann die RNA-Microinjektion unter einem Stereomikroskop mittels einer manuellen Injektionspumpe. Nach der Inkubation der Oozyten für zwei bis drei Tage bei 16-18° wurde die formgebende und transparente Vitellinschicht um die Plasmamembran mit spitzgeschliffenen Pinzetten manuell entfernt und die Oozyte in die Messlösung überführt. Die Messung erfolgte wie in Abschnitt 2.1 beschrieben in der 'inside-out'-Konfiguration. Je nach Größe und Stabilität der Stromantworten wurde die RNA zur optimalen Expression mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

## 2.7 Aufbau und Messpraxis der Patch-Clamp-Technik

Aus dickwandigen Borosilicat-Kapillaren (Science Products GmbH) wurden zunächst die benötigten Patch-Pipetten spitz ausgezogen und im Anschluss zur Abrundung der Glasränder auf einen Öffnungsdurchmesser von 5-10  $\mu\text{m}$  hitzepoliert (Mikro Forge, Narishige). Die stumpfe Pipettenspitze wurde zur verbesserten Abdichtung mit der Plasmamembran in Paraffin-Öl getaucht und die Pipette via eines Mikrofilamentes mit extrazellulärer Messlösung befüllt. Nach Bildung eines Gigaseals und Entreißen des etwa 75-300  $\mu\text{m}^2$  großen Areals der Plasmamembran (Macro-Patch), ermöglichte ein Mikromanipulator den schnellen Wechsel des Messmediums durch die Steuerung der Patch-Pipette vor ein mehrgängiges Applikationssystem (Abbildung 11).

Die Messung der Änderung des Membranpotentials erfolgte stets gegen eine AgCl-Referenzelektrode innerhalb der Messlösung. Das über die Ag/AgCl-Messelektrode detektierte Signal wurde in den Vorverstärker (Headstage, EPC10, HEKA) geleitet, dort invertiert und in den Verstärker (Patch-Clamp-Verstärker, EPC10, HEKA) eingespeist. Nach erneuter Signalsteigerung und Invertierung gelangte das Signal über einen Analog-Digital-(A/D)-Wandler in den Messrechner, welcher die nun digitalisierten Daten verarbeitete. Mit Hilfe der PatchMaster-Software (HEKA) konnten die Signale erfasst, reguliert und analysiert werden. Voreingestellte Regulationsprotokolle dienten zur Festlegung der Messkonfigurationen und regulierten die Membranspannung im jeweils notwendigen Maße. Das generierte Antwortsignal wurde zunächst wieder analogisiert und nach erneuter zweifacher Invertierung in Verstärker und Vorverstärker, zurück auf die Messelektrode geleitet.



**Abbildung 11:** Technischer Aufbau der Patch-Clamp-Experimente. Messkammer mit Oozytenbad, mehrgängigem Applikationssystem und Mess-, sowie Referenzelektrode. Die gemessene Spannungsänderung wird vorverstärkt (EPC10 Headstage, HEKA), dann in den Patch-Clamp Verstärker (EPC10, HEKA) geleitet, nach Analog-Digitalumwandlung in den Messrechner eingespeist und mittels PatchMaster-Software (HEKA) analysiert.

Zur Vermeidung von elektrischen Störungen wurde die Erdung von Referenz und Verstärker auf alle elektronischen Komponenten ausgedehnt. Sowohl das verwendete inverse Mikroskop (Zeiss), als auch der Mikromanipulator (phythron<sup>R</sup>) wurden mit dem System auf einem Potential gehalten. Die Platzierung des Messaufbaus auf einem schwingungsgedämpften Tisch (TMC<sup>TM</sup>) umgeben von einem Faradaykäfig, ermöglicht dann die weitestgehend störungsfreie Messung von Membranströmen zwischen  $10^{-11}$  bis  $10^{-7}$  Ampere.

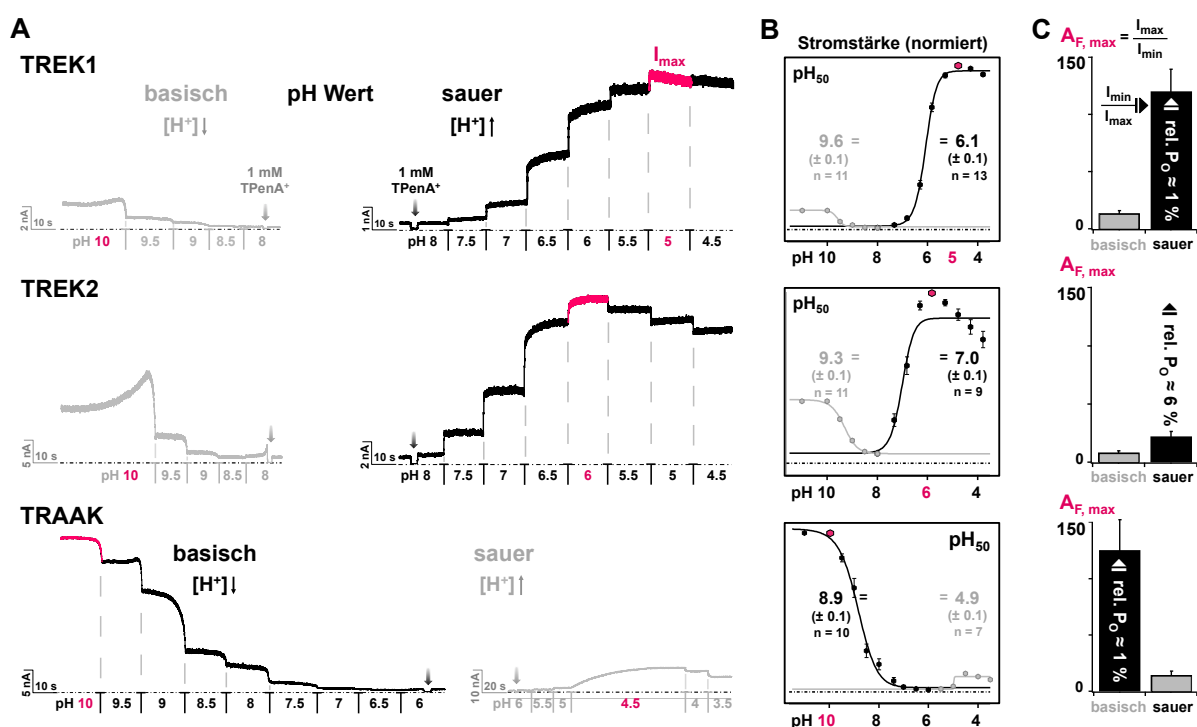
### 3 Ergebnisse

Dieser Abschnitt der vorliegenden Arbeit fasst die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen an den  $K_{2P}$ -Kanälen TREK1, TREK2 und TRAAK zusammen. Detaillierte Beschreibungen zu den Methoden und Auswertungen sind im Abschnitt 2 zu finden.

Zur Analyse der intrazellulären Regulation der TREK/TRAAK-Subfamilie wurde im Rahmen dieser Dissertation ausschließlich die 'inside-out'-Patch-Clamp-Technik verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Messungen bei Raumtemperatur, einem kontinuierlichen Membranpotential von -80 mV und unter symmetrischen Kaliumbedingungen mit je 120 mM  $K^+$  innen und außen durchgeführt. Die vollständigen Angaben zu allen verwendeten Lösungen und Geräten finden sich im Anhang (Abschnitt 5.1 - 5.4).

#### 3.1 Intrazelluläres pH-Gating der TREK/TRAAK-Subfamilie

Die pH-Regulierbarkeit der  $K_{2P}$ -Kanalfamilie wurde bereits in vorausgehenden Arbeiten beschrieben und dabei die polymodal stimulierbare TREK/TRAAK-Subfamilie als potent  $pH_i$ -aktivierbare Untergruppierung identifiziert (siehe Abschnitt 1.3). Einleitende Experimente zur Verifizierung der bereits publizierten Daten zur Aktivierung der Kanäle im sauren und basischen Milieu ([Maignret et al., 1999b; Kim et al., 2001a]) zeigten deutliche Unterschiede innerhalb der Subfamilie. Abbildung 12 stellt die  $pH_i$ -induzierte Aktivierung von TREK1-, TREK2- und TRAAK-Kanälen anhand der Stromantworten (A) und deren Auswertung (B + C) vergleichend dar.



**Abbildung 12:** Die intrazelluläre pH-Aktivierung von TREK1-, TREK2- und TRAAK-Kanälen. **A:** Beispiele der Stromantworten der TREK/TRAAK-Subfamilie innerhalb des stabilen Messbereichs von pH 10 bis pH 4.5 / 3.5 (-80 mV) mit initialem 1 mM TPenA<sup>+</sup>-Block (Pfeile). **B:** pH<sub>50</sub>-Bestimmungen der sauren und alkalischen Aktivierung via Hill-Gleichung und **C:** maximale Stromsteigerung der Kanäle als Aktivierungsfaktoren des basischen ( $A_{F,max} = I_{max}/I_{min}$ , TREK1, TREK2 und TRAAK: pH 10) und sauren Milieus ( $A_{F,max}$ , TREK1: pH 5, TREK2: pH 6, TRAAK: pH 4.5).

Die dargestellten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der TREK/TRAAK-Subfamilie (Abbildung 12A) wurden durch eine schrittweise Erhöhung des pH-Wertes um 0.5 generiert und anschließend mittels der Hill-Gleichung geplottet und vergleichend analysiert (Abbildung 12B). Die halbmaximale Aktivierung des TREK1-Kanals ( $\text{pH}_{50}$ ) lag im sauren Milieu bei pH 6.1 ( $\pm 0.1$ ,  $n = 13$ , Abbildung 12B, schwarz) und die maximale Stromsteigerung des TREK1-Kanals lieferte die Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes ( $\text{pH}_i$ ) auf 5 (Abbildung 12A+C,  $A_{F, \max}$ , rot). Hierbei kam es zu einer 120-fachen Zunahme des Grundstromes ( $\pm 19$ ,  $n = 13$ ), welche durch den Aktivierungsfaktor  $A_{F, \max}$  (Abbildung 12C, schwarz) beschrieben wird und sich durch Quotientenbildung aus maximal  $\text{pH}_i$ -aktivierbarem Strom ( $I_{\text{pH } 5}$ ) und Grundstrom ( $I_{\text{pH } 8}$ ) ergibt. Reziproke Betrachtung liefert dann die basale Offenwahrscheinlichkeit relativ zum  $\text{pH}_i$ -aktivierbaren Maximalstrom bei pH 5 und ergab im Falle des TREK1-Kanals eine relative Offenwahrscheinlichkeit von etwas über 1 % ( $\pm 0.2$ ,  $n = 13$ , wobei  $I_{\text{TPenA}^+} = 0$  %). Die Stromzunahmen des TREK1-Kanals fiel im basischen  $\text{pH}_i$ -Bereich, mit einer maximalen Aktivierung des Faktors 14 ( $\pm 2$ ,  $n = 11$ ,  $A_{F, \max}$ , Abbildung 12C, grau), deutlich geringer aus und wurde mit einem  $\text{pH}_{50}$  von 9.6 ( $\pm 0.1$ ,  $n = 11$ , Abbildung 12B, grau) erst bei sehr niedrigen Protonenkonzentrationen erreicht.

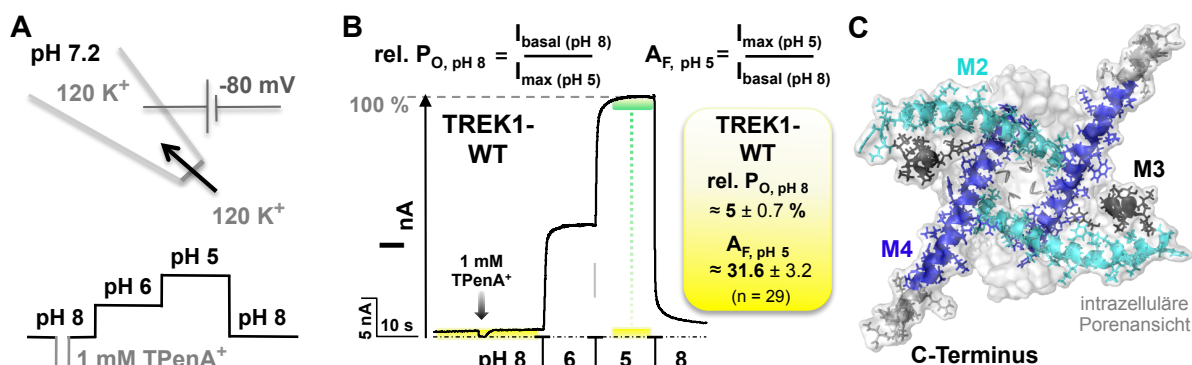
Die  $\text{pH}_i$ -Stimulation des zu 78 % sequenzhomologen TREK2-Kanals zeigte klar unterscheidbare Kanaleigenschaften. Zum Einen erreichte die Stromzunahme ihr Maximum hier bereits bei einem pH-Wert von 6 (Abbildung 12A, TREK2, rot). Zum Anderen wirkte sich die vergleichbar hohe basale relative Offenwahrscheinlichkeit des TREK2-Kanals von etwa 6 % ( $\pm 0.1$ ,  $n = 9$ ) dramatisch auf die Stärke der  $\text{pH}_i$ -Aktivierung aus. Die möglichen Stromsteigerungen waren hier deutlich geringer, als bei der TREK1-Aktivierung niedriger Grundaktivität. Die ermittelten TREK2-Aktivierungsfaktoren von 22 ( $\pm 4$ ,  $n = 9$ ,  $A_{F, \max}$ , Abbildung 12C, TREK2) im sauren und 9 ( $\pm 1$ ,  $n = 11$ ) im basischen, zeigten vergleichbare Stromzunahmen durch Erhöhung oder Erniedrigung des  $\text{pH}_i$ -Wertes (Abbildung 12C, TREK2). Die halbmaximale Aktivierung lag im basischen Milieu ( $\text{pH}_{50, b}$ ) mit pH 9.3 ( $\pm 0.1$ ,  $n = 11$ , Abbildung 12B, TREK2, grau) und 7.0 ( $\pm 0.1$ ,  $n = 9$ , Abbildung 12B, TREK2, schwarz) in saurer Umgebung ( $\text{pH}_{50, s}$ ), jeweils näher am minimal leitenden Grundzustand des Kanals in pH 8.

Die  $\text{pH}_i$ -Aktivierung des TRAAK-Kanals zeigte nahezu reziproke maximale Aktivierungsfaktoren gegenüber dem TREK1-Kanal. Die maximale Stromsteigerung um den Faktor 126 ( $\pm 27$ ,  $n = 10$ ,  $A_{F, \max}$ , Abbildung 12C, TRAAK) zeigte sich hier bei  $\text{pH}_i$  10, also in basischer Umgebung. Ob diese Aktivierung maximal war, konnte aufgrund der Patch-Instabilität ab einem pH-Wert von 11 nicht abschließend bestimmt werden. Die azide Aktivierung resultierte lediglich in 15-facher ( $\pm 4$ ,  $n = 7$ ,  $A_{F, \max}$ , Abbildung 12C, TRAAK) Stromzunahme der geringen, basalen relativen Offenwahrscheinlichkeit des TRAAK-Kanals im Grundzustand bei  $\text{pH}_i$  6. Zudem ergab sich ein  $\text{pH}_{50, s}$  von 4.9 ( $\pm 0.1$ ,  $n = 7$ , Abbildung 12B, grau) und ein  $\text{pH}_{50, b}$  von 8.9 ( $\pm 0.1$ ,  $n = 10$ , Abbildung 12B, schwarz).

### 3.2 Cystein-Mutagenese identifiziert funktionell kritische Aminosäuren

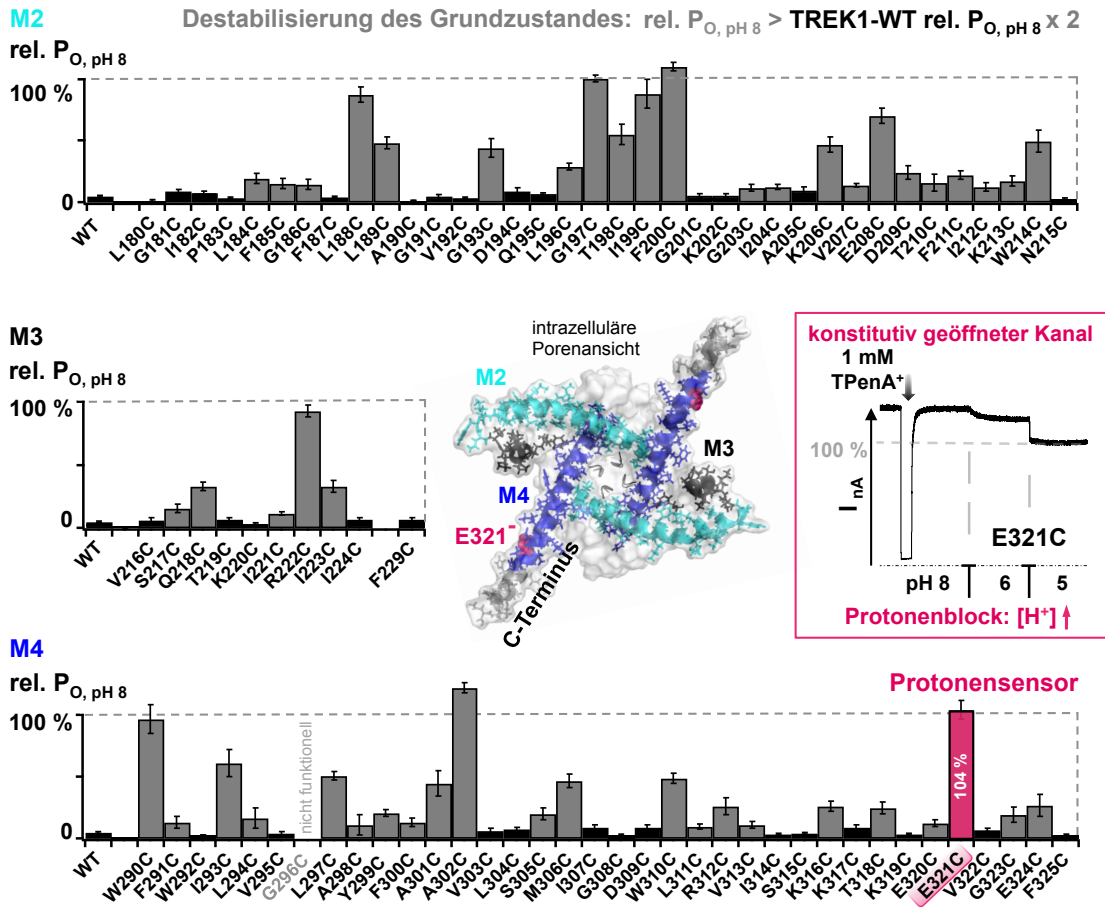
Die Modellvorstellung der intrazellulären pH-Aktivierung von TREK-Kanälen über Porensegmentbewegungen nach C-terminaler Protonierung, beruht auf der Entdeckung des  $\text{pH}_i$ -sensorischen Glutamates im proximalen C-Terminus [Honoré et al.,2002], den bereits publizierten Kristallstrukturen [Browhan et al.,2012/2014b; Dong et al.,2015; Lolicato,2015], sowie einem Verlust der Weiterleitung C-terminaler Signale durch Mutationen innerhalb des M4-Segmentes des TREK2-Kanals [Zhuo et al.,2016]. Der Mechanismus der Übertragung des Signals über das M4-Segment hinweg auf den regulierten Selektivitätsfilter ist bisher ungeklärt. Die Identifizierung beteiligter Aminosäuren der Porensegmente ist daher von zentraler Bedeutung und wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst durch den systematischen Austausch einzelner Aminosäuren untersucht.

Alle drei Mitglieder der TREK/TRAAK-Subfamilie leiten bei physiologischem  $pH_i$  nur wenig Strom. Die potente  $pH_i$ -Aktivierung der niedrigen Grundaktivität ist demnach mit der Kanalöffnung aus dem Grundzustand zu assoziieren. Die besonders niedrige Grundaktivität des TREK1-Kanals im physiologischen  $pH_i$ -Bereich von 7.2, sowie dessen potente azide Aktivierung (Abbildung 12), qualifizieren TREK1 als Modellkanal zur Aufklärung der  $pH_i$ -Regulierung der TREK/TRAAK-Subfamilie. Die Bestimmung der halbmaximalen effektiven Protonenkonzentration ( $pH_{50}$ ), sowie des Hill-Koeffizienten ( $H_K$ ) zeigte sich zur vergleichenden Auswertung ungeeignet, da die Cystein-Substitution die Grundaktivität vieler TREK1-Mutanten drastisch steigerte. Anhand der Stromantworten des nativen TREK1-Kanals (Abbildung 12A+C, sauer) wurden daher die Stromstärken im Grundzustand bei  $pH_i$  8 (Basalstrom), bei halbmaximaler Aktivierung ( $pH_i$  6) und nach maximaler Stromsteigerung ( $pH_i$  5) bestimmt und so zunächst die Destabilisierung des Grundzustandes analysiert (Abbildung 13A+B).



**Abbildung 13:** Messprotokoll zur Analyse der Gating-Funktionalität einzelner Aminosäure-Substitutionen in den porenformenden Segmenten M2, M3 und M4 des TREK1-Kanals. **A:** Inside-out Patch-Clamp-Messprotokoll mit  $pH_i$ -Wechsel von 8 auf 6 und 5 (symmetrisch 120 mM  $K^+$  innen und außen, bei konstant -80 mV) mit  $TPenA^+$ -Block in pH 8. **B:** Typische Stromantwort des TREK1-WT-Kanals, mit exemplarischer Bestimmung der basalen, relativen Offenwahrscheinlichkeit ( $rel. P_{O, pH 8}$ ) von 5 % ( $\pm 0.7$ ,  $n = 29$ ), relativ zum maximal  $pH_i$  5-aktivierbaren Strom. **C:** C-terminale Kanalansicht der analysierten Seitenketten der Porensegmente M2, M3 und M4 im Strukturmodell (PDB-ID: 6cq6, [Lolicato et al., 2017]).

Als Maß für die Beurteilung des Substitutionseffektes auf die Grundaktivität der Kanäle, wurde die basale relative Offenwahrscheinlichkeit als Quotient aus Basal- ( $pH_i$  8) und Maximalstrom ( $pH_i$  5) herangezogen. In diesem dreistufigen  $pH_i$ -Messprotokoll zeigte sich für den TREK1-WT eine relative Offenwahrscheinlichkeit von 5 % ( $\pm 0.7$ ,  $n = 29$ , Abbildung 13B) und ein mittlerer Aktivierungsfaktor  $A_{F, pH 5}$  von 31.6 ( $\pm 3.2$ ,  $n = 29$ ). Zur Diskriminierung von Kanal- und Hintergrundströmen wurde der Basalstrom der Kanäle ( $pH_i$  8) stets mit 1 mM  $TPenA^+$  blockiert und so der Hintergrund jeder Messung bestimmt (Abbildung 12 und 13, ff., Blockpfeile). Abbildung 14 fasst die relativen Offenwahrscheinlichkeiten des Grundzustandes der drei untersuchten Porensegmente in Balkendiagrammen zusammen. 32 Kanäle der insgesamt 82 Cystein-substituierten Loki zeigten keine signifikante Steigerung der Grundaktivität (Abbildung 14, schwarze Balken). Der Austausch der 49 übrigen Aminosäuren offenbarte jedoch eine große Variabilität innerhalb der Grundaktivität der untersuchten Kanäle. War der Basalstrom gegenüber dem nativen TREK1-Kanal (Abbildung 14, gelb) mindestens verdoppelt, so wurde die entsprechende TREK1-Mutation als destabilisierend eingestuft (Abbildung 14, graue Balken). Die relativen Offenwahrscheinlichkeiten lagen zwischen 10 % ( $\pm 0.1$ ,  $n = 20$ , Abbildung 14, D309C) und 122 % ( $\pm 5$ ,  $n = 20$ , Abbildung 14, A302C). Einzig im Falle des TREK1-G296C waren keine funktionellen Kanäle exprimierbar.

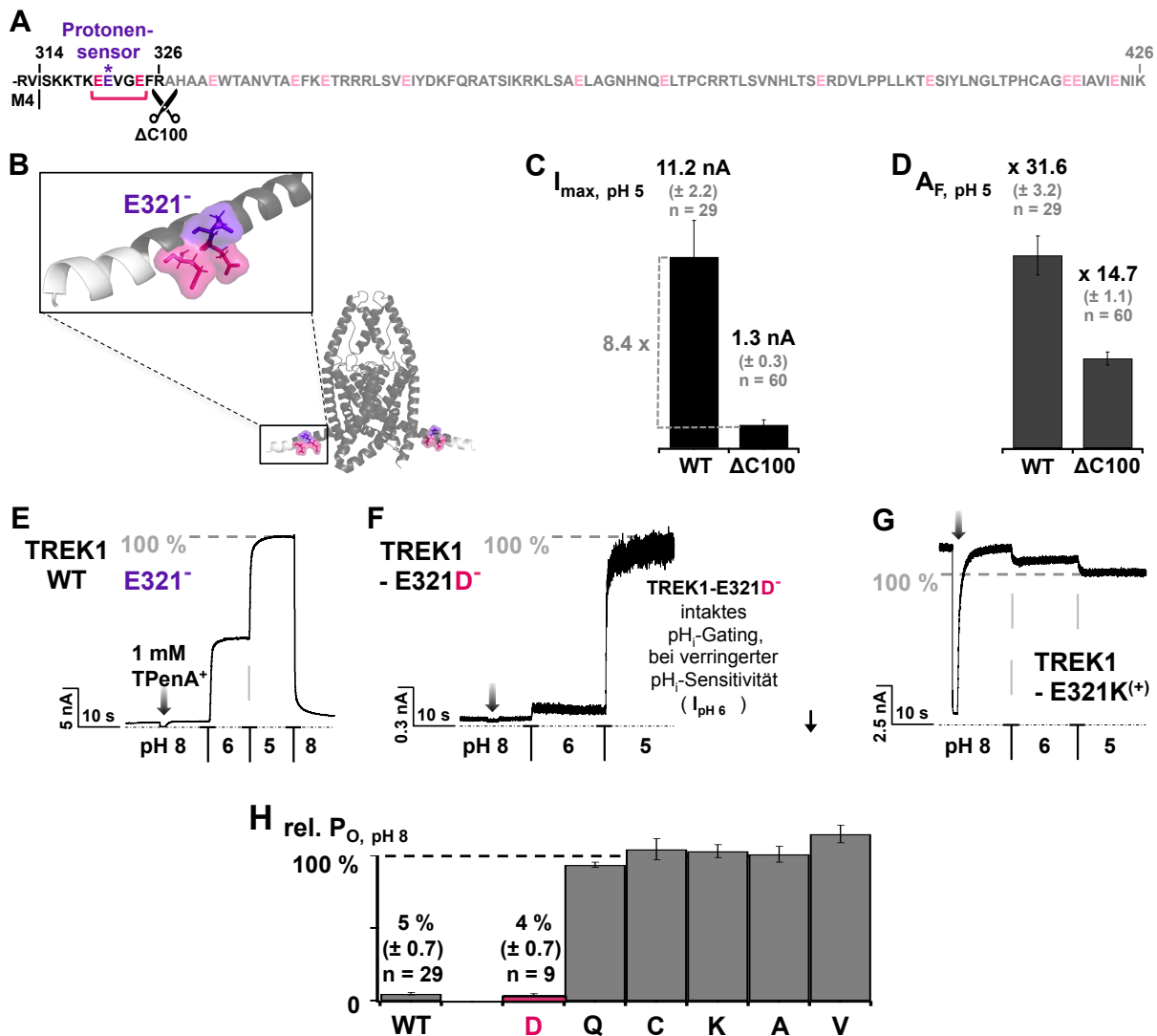


**Abbildung 14:** Die Steigerung der Grundaktivität des TREK1-Kanals durch Cystein-Substitution von Aminosäure-Seitenketten der porenformenden Segmente M2, M3 und M4. Eine mindestens verdoppelte, relative Offenwahrscheinlichkeit ( $P_O$ , graue Balken) gegenüber der des TREK1-WT-Kanals ( $5 \pm 0.7 \%$ ,  $n = 29$ , gelb) deutet auf eine Grundzustandsdestabilisierung, bis zum völligen Verlust der  $pH_i$ -Regulierbarkeit bei  $P_O \cong 100 \%$ , hin. Mitte: Lokalisation der 82 Mutationen im Strukturmodell (intrazelluläre Porenansicht, PDB-ID: 6cq6, [Lolicato et al.,2017]), sowie die Stromantwort von TREK1-E321C (M4, Protonensensor, rot, Kasten) als darstellendes Beispiel eines Protonenblocks, sichtbar durch den Gatingverlust der Kanalmutation.

Bedingt durch die oben beschriebene Normierung auf den maximal  $pH_i$ -aktivierbaren Strom bei  $pH_i 5$  (TREK1-WT), repräsentiert eine relative Offenwahrscheinlichkeit ( $pH_i 8$ ) über  $100 \%$  einen konstitutiv geöffneten Kanal. Als darstellendes Beispiel ist hier das  $pH_i$ -sensorische TREK1-E321C gezeigt (Abbildung 14, rot). Eine  $pH_i$ -regulierte Schließung der Kanäle war hier nicht mehr zu erreichen und eine dauerhafte Kanalöffnung war die Folge. Eine Erhöhung der Protonenkonzentration resultierte in einer Inhibition, wobei sich die Stromgrößen der verschiedenen  $pH_i$ -Zustände nur geringfügig unterschieden. 1mM TPenA<sup>+</sup> blockierte den Strom nahezu vollständig und schloss so einen Einfluss von Hintergrundströmen auf die gemessenen Stromgrößen aus. Ursächlich für die  $pH_i 5$ -bedingte Stromabnahme war hier offenbar ein direkter Protonenblock durch hohe H<sup>+</sup>-Konzentrationen innerhalb der Kanalporen [Chen et al.,1996; Starkus et al.,2003; Khan et al.,2006; Van Slyke,2012], welcher im  $pH_i$ -aktivierten Strom stabilerer Strukturen nicht sichtbar war. Kanäle dieses Phänotyps zeigten demnach keinerlei Sensitivität für Protonen mehr. Cystein-Mutationen mit einer relativen Offenwahrscheinlichkeit  $\geq 50 \%$  werden nun im folgenden als funktionell kritisch eingestuft, in den Abbildungen 15 bis 21 im Einzelnen dargestellt und ihre jeweiligen strukturellen Besonderheiten erläutert.

3.2.1 Der C-Terminus und pH<sub>i</sub>-sensorische Bereiche

Der titrierbare Sensorbereich für die Regulation der TREK1-Kanalaktivität über intrazelluläre Protonen liegt im proximalen C-Terminus und wird geformt durch die Glutamate TREK1-E320<sup>-</sup> und -E324<sup>-</sup>, mit TREK1-E321<sup>-</sup> (Abbildung 15A,B+E, violett), als pH<sub>i</sub>-sensorischer Seitenkette [Honoré et al.,2002]. Die Trunkierung des Glutamat-reichen distalen C-Terminus ( $\Delta$ C100, Abbildung 15A) hinter TREK1-R326 verringerte die messbaren Stromgrößen um etwa das achtfache ( $I_{max}$ , pH 5, Abbildung 15C), die Gatingfunktion und pH<sub>i</sub>-Aktivierbarkeit (Abbildung 15D) blieben jedoch erhalten.



**Abbildung 15:** Trunkierung des distalen C-Terminus hinter TREK1-R326 und Permutation des pH<sub>i</sub>-sensorischen E321<sup>-</sup>. **A:** C-terminale Sequenz des TREK1-WT mit  $\Delta$ C100-Trunkierung und den Glutamaten TREK1-E321<sup>-</sup> (violett), -E320<sup>-</sup> und -E324<sup>-</sup> (rot). **B:** C-Terminus mit den entsprechend zu A markierten Glutamaten im Strukturmodell (PDB-ID: 6cq6, [Lolicato et al.,2017]). **C:** Die maximal pH<sub>i</sub>-generierbare Stromstärke ( $I_{max}$ ) war ohne distalen C-Terminus um das 8.4-fache verringert. **D:** Ein nahezu halbiertes Aktivierungsfaktor bedingt eine etwa verdoppelte Grundaktivität im Vergleich zum TREK1-WT-Kanal im 3-Punkt-Messprotokoll). Stromantworten der **E:** TREK1-WT-E321<sup>-</sup>, **F:** TREK1-E321D<sup>-</sup>, **G:** TREK1-E321K<sup>+</sup>, **H:** Mutationen zu neutralen (Q, A, V) oder positiv geladenen Seitenketten (C, K) öffneten den Kanal dauerhaft (rel.  $P_o \approx 100\%$ ), einzig die E321D<sup>-</sup>-Mutation (rot) zeigte einen inaktiven Kanalzustand.

Im dreistufigen  $\text{pH}_i$ -Messprotokoll ergab sich eine basale relative Offenwahrscheinlichkeit des TREK1-WT-Kanals von 5 % ( $\pm 0.7$ ,  $n = 29$ , Abbildung 13B) sowie ein mittlerer Aktivierungsfaktor ( $A_{F, \text{pH } 5}$ ) von 31.6 ( $\pm 3.2$ ,  $n = 29$ , Abbildung 15C). Die leicht erhöhte Grundaktivität des TREK1- $\Delta\text{C}100$  von 9 % ( $\pm 0.6$ ,  $n = 60$ ) war auf eine weniger potente  $\text{pH}_i$ -Aktivierung zurückzuführen ( $A_{F, \text{pH } 5} = 14.7 \pm 1.1$ ,  $n = 60$ , Abbildung 15C), da durch Bindung pharmakologischer Aktivatoren innerhalb der TREK1-Pore, vergleichbare basale relative Offenwahrscheinlichkeiten von TREK1- $\Delta\text{C}100$  und TREK1-WT-Kanal beobachtbar waren (nicht gezeigt).

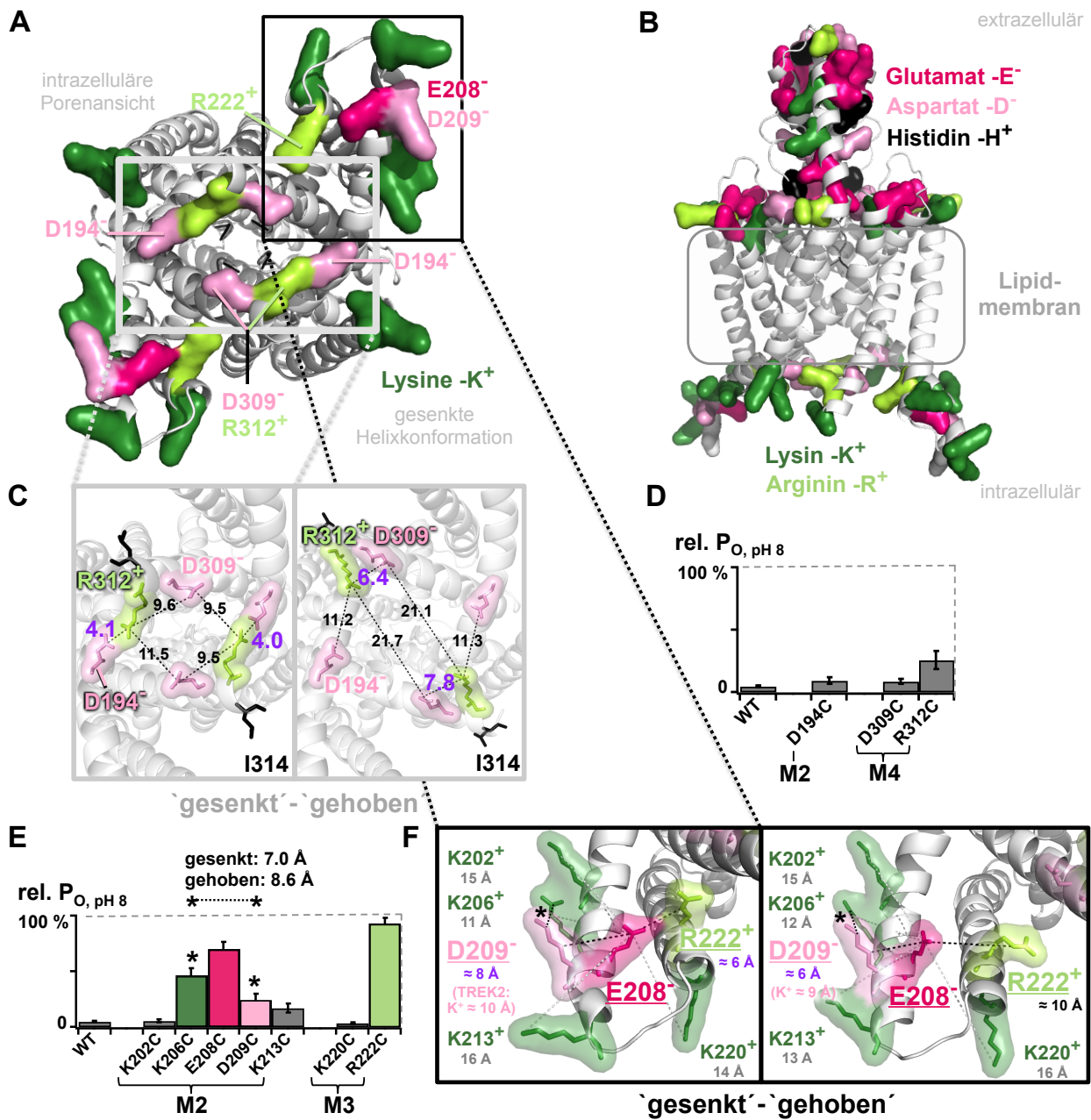
Eine Analyse der beiden C-terminalen Mutationen TREK1-E320C und -E324C des  $\text{pH}_i$ -sensorischen Glutamatbündels bestätigte die grundlegende Rolle des TREK1-E321<sup>-</sup> bei der protoneninduzierten Aktivierung des Kanals. Es zeigten sich lediglich leicht erhöhte, aber nicht kritisch gesteigerte Grundaktivitäten von TREK1-E320C (rel.  $P_O = 13 \pm 2.7\%$ ,  $n = 6$ ) und -E324C ( $27 \pm 8.7\%$ ,  $n = 6$ ), im direkten Vergleich zu TREK1-E321C ( $104 \pm 7.4\%$ ,  $n = 6$ , Abbildung 14, M4). Das in Abbildung 14 bereits exemplarisch dargestellte Glutamat E321<sup>-</sup> zeigte sich auch hier als primäre  $\text{pH}_i$ -sensorische Seitenkette des TREK1-Kanals für Änderungen der Protonenkonzentration, da der Kanal durch E321<sup>-</sup>-Substitution gegen verschiedene Aminosäuren seine Gatingfunktion verlor (Abbildung 15F,G+H). Allein die Substitution gegen das ebenfalls negativ geladene Aspartat (E321D<sup>-</sup>, Abbildung 15G) konnte die Gating-Funktion des Kanals erhalten, wohingegen der Austausch gegen positiv geladene ( $\text{K}^+$ , Abbildung 15G+H) oder ungeladene (A, Q und V, Abbildung 15H) Aminosäureseitenketten zu konstitutiv geöffneten Kanälen führte, welche stets einen Protonenblock zeigten.

Die veröffentlichte TREK1-Kristallstruktur (PDB-ID: 6cq6, [Lolicato et al.,2017]) bildet lediglich die gehobene Konformation der TREK1-Helices ab. Um die Lage der einzelnen Seitenketten in gesenkter und gehobener Struktur betrachten zu können, wurden die publizierten Kristallstrukturen (PDB-ID: 4XDJ/4BW5 [Dong et al.,2015]) des zu 78 % sequenzhomologen TREK2-Kanals als Strukturmodelle gewählt. Die farbliche Markierung aller geladenen Aminosäuren in der Proteinstruktur (Abbildung 16) zeigt die primäre Lokalisation negativ geladener Seitenketten (Glutamat E<sup>-</sup>, rot ; Aspartat D<sup>-</sup>, rosa) in den extrazellulären Proteinregionen, wohingegen die intrazellulären Bereiche der Helices vornehmlich positiv geladene Lysin- ( $\text{K}^+$ , grün) und Arginin-Seitenketten ( $\text{R}^+$ , hellgrün) tragen. Die Lipidmembran durchspannenden Regionen sind nicht titrierbar, weisen also keine geladenen Seitenketten auf (Abbildung 16B).

In der intrazellulären Porenansicht des TREK2-Modelles (gesenkte Struktur, PDB-ID: 4XDJ [Dong et al.,2015], Abbildung 16A+C) zeigt sich ein säumender Ring aus vier Aspartat-Residuen (TREK1-D194<sup>-</sup> und -D309<sup>-</sup>) und zwei Argininen (TREK1-R312<sup>+</sup>) um den Poreneingang der stets geöffneten, unteren Verengung der TREK-Kanalpore (analog einem 'helix bundle crossing', Abbildung 16C, PDB-ID: 4XDJ/4BW5 [Dong et al.,2015]). Eine Stabilisierung des Poreneinganges durch ionische Interaktionen ist hier nicht auszuschließen. Eine essentielle Rolle dieser Aminosäuren ist aber aufgrund der lediglich leicht gesteigerten Grundaktivitäten nach Austausch gegen Cysteine unwahrscheinlich (Abbildung 16D, rel.  $P_{O, \text{pH } 8}$ : TREK1-D194C =  $10\% \pm 2.5$ ,  $n = 12$  ; -D309C =  $10\% \pm 2.1$ ,  $n = 20$  und -R312C =  $26\% \pm 7.0$ ,  $n = 6$ ).

Durch die Proteinorientierung des TREK1-R312<sup>+</sup> (Abbildung 16A+C) zusammen mit der cytosolischen Lokalisation der TREK1-K316<sup>+</sup> (nicht gezeigt, PDB-ID: 6cq6 [Lolicato et al.,2017]), wurde der Übergang von M4 in den C-Terminus an der Position TREK1-I314 (Abbildung 16C, schwarz) festgelegt.





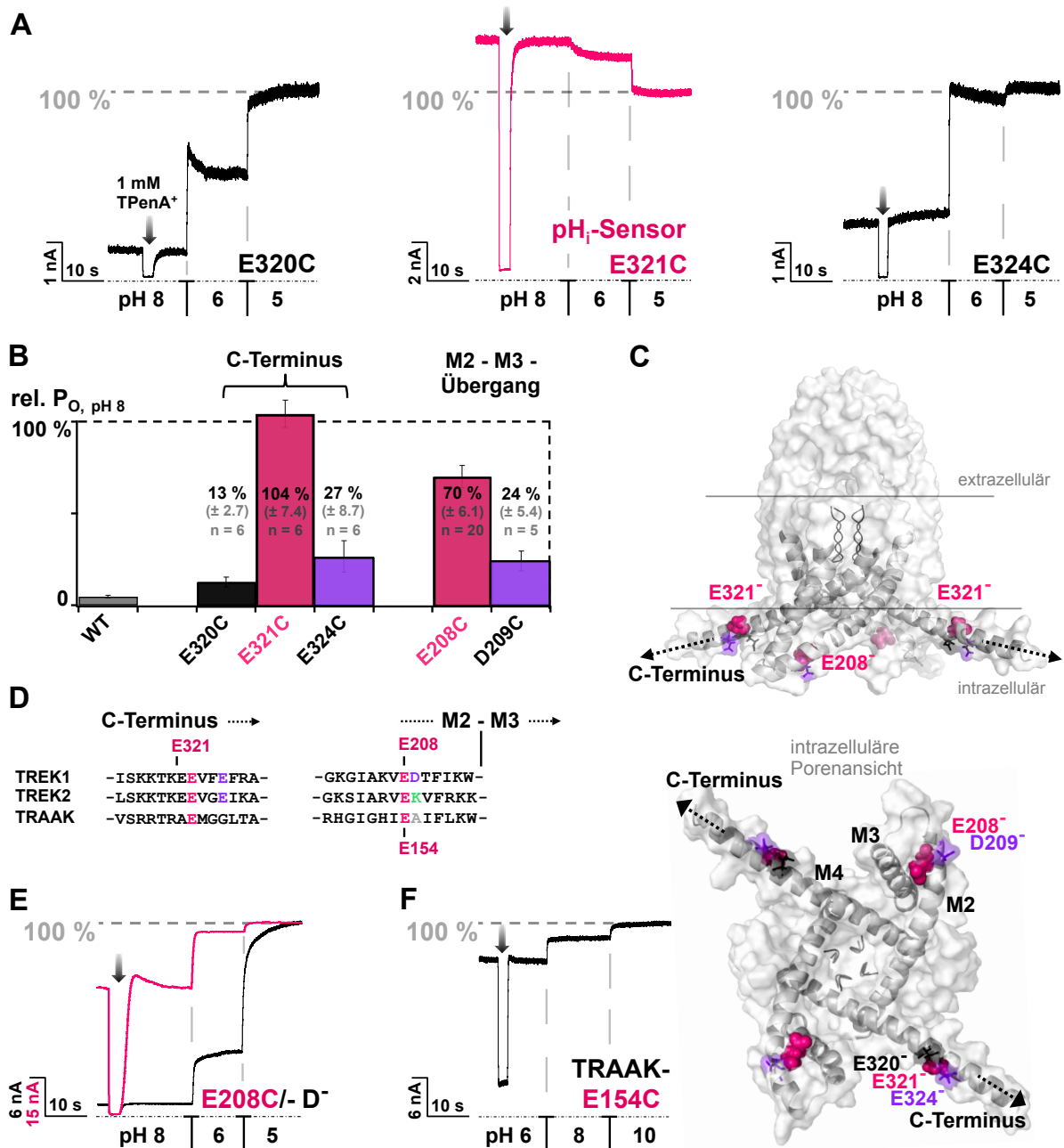
**Abbildung 16:** Die Verteilung aller geladenen Seitenketten innerhalb des TREK1-Kanals. Glutamate (E<sup>-</sup>, rot), Aspartate (D<sup>-</sup>, rosa), Histidine (H<sup>+</sup>, schwarz), Lysine (K<sup>+</sup>, grün) und Arginine (R<sup>+</sup>, hellgrün) im Strukturmodell (PDB-ID: 4XDJ/4BW5 [Dong et al.,2015]), **A**: intrazelluläre Porenansicht und **B**: Frontalebene. **C**: Fokus auf den poren säumenden Arpartat-Arginin-Ring aus TREK1-D194<sup>-</sup>, -D309<sup>-</sup> und -R312<sup>+</sup> am unteren Poreneingang (Vergleich: gesenkter und gehobener Zustand PDB-ID: 4XDJ/4BW5, [Dong et al.,2015], I314, schwarz, Übergang zum C-Terminus) mit WT-ähnlichen Grundaktivitäten der entsprechenden Cystein-Mutationen (**D**). **E**: Relative, basale Offenwahrscheinlichkeiten nach Cystein-Substitution der geladenen M2-M3-Seitenketten um TREK1-E208<sup>-</sup> deuten auf eine mögliche ionische E208<sup>-</sup>-R222<sup>+</sup>-Interaktion im geschlossenen Zustand des Kanalproteins (pH<sub>i</sub>: 8). Zudem erhöhte Grundaktivität von TREK1-K206C und -D209C (\*) mit Seitenkettenabständen von 7.0 Å in gesenkter und 8.6 Å in gehobener Konformation. **F**: Fokus auf die Ladungsumgebung des einzigen intrazellulären Glutamates der TREK1-Pore (TREK1-E208<sup>-</sup>), lokalisiert im Übergang von M2 zu M3. Lage und Entfernung der geladenen Seitenketten in struktureller Nähe zu TREK1-E208<sup>-</sup>, mit -D209<sup>-</sup> (8 Å, rosa) und -R222<sup>+</sup> (6 Å, hellgrün/schwarz) in Interaktionsreichweite bei gesenkter Konformation der Helices (violett, links).

Im Übergang von M2 zu M3 sorgt der Cystein-Austausch von TREK1-E208<sup>-</sup> für einen nahezu vollständigen Verlust der pH<sub>i</sub>-Aktivierbarkeit, mit einer basalen relativen Offenwahrscheinlichkeit von 70 % ( $\pm 6.1$ , n = 20, Abbildung 16E) und identifiziert diese TREK/TRAAK konservierten Glutamat-Seitenketten als grundlegende Aminosäure der Gatingfunktion der TREK1-Kanalpore (Abbildung 16F). Eine Betrachtung der Abstände des TREK1-E208<sup>-</sup> zu umliegenden, geladenen Seitenketten, zeigt das positiv geladene, TREK/TRAAK konservierte Arginin R222<sup>+</sup>, welches im gesenkten Kanalzustand in ausreichender Nähe für eine E208<sup>-</sup>-R222<sup>+</sup>-Interaktion orientiert ist (Abbildung 16E, links, E208<sup>-</sup>-R222<sup>+</sup>  $\approx 6$  Å). In gehobener Struktur erweitert sich die Distanz auf 10 Å, sodass es sich, wie die übrigen umliegenden, geladen Seitenketten (TREK1-K202<sup>+</sup>, -K206<sup>+</sup>, -R212<sup>+</sup> (I212 in der TREK2-Struktur [Dong et al.,2015]), -K213<sup>+</sup> und -K220<sup>+</sup>, Abbildung 16E), nicht in Interaktionsnähe zu TREK1-E208<sup>-</sup> befindet (Abstand > 10 Å, Abbildung 16E, grau). Auch die hohe Grundaktivität nach Cystein-Austausch von TREK1-R222<sup>+</sup> (rel. P<sub>O</sub> = 93 %  $\pm 4.9$ , n = 20, Abbildung 16F) deutet auf eine grundlegende Rolle dieser Arginin-Seitenketten für die Stabilisierung des inaktiven Grundzustandes des TREK1-Kanals hin.

Das benachbarte, negativ geladene Aspartat TREK1-D209<sup>-</sup> zeigt in gesenkter Konformation einen 7.0 Å Abstand zu TREK1-K206<sup>+</sup> (rel. P<sub>O</sub> = 47  $\pm 6.1$  %, n = 10, Abbildung 16E, \*) und 8.6 Å in gehobener Struktur, wodurch eine ionische Interaktion möglich wird. Der E208<sup>-</sup>-D209<sup>-</sup>-Abstand ändert sich beim Übergang von gesenkter zu gehobener Struktur ebenfalls nur wenig (Abbildung 16E, D209<sup>-</sup>, rosa, 6 - 8 Å). Somit formt sich ein doppelt negativ geladenes Motiv im unteren Bereich des Porenssegmentes M2, mit einem nahezu vollständigen Verlust der Kanalfunktion nach Cystein-Austausch des TREK1-E208<sup>-</sup>.

Die leicht erhöhten relativen Offenwahrscheinlichkeiten des TREK1-E320C (13  $\pm 2.7$  %, n = 6, Abbildung 17A+B, schwarz) und TREK1-E324C (27  $\pm 8.7$  %, n = 6, Abbildung 17A+B, violett), waren mit der des TREK1-D209C, bei einer Grundaktivität von 24 % ( $\pm 5.4$ , n = 10, Abbildung 17B, violett), vergleichbar und deuten auf eine mögliche Beteiligung dieser Seitenketten an der Detektion der pH<sub>i</sub>-Umgebung des TREK1-Kanals. Die negativen Ladungen liegen etwa in der selben Ebene und bilden ein sensorisches Glutamat-Quadrat um den intrazellulären Poreneingang des TREK1-Kanals (Abbildung 17C, rot). Abbildung 17C zeigt die Lokalisation von TREK1-E321<sup>-</sup> und -E208<sup>-</sup> im TREK1-Strukturmodell (PDB-ID: 6cq6, [Lolicato et al.,2017]). TREK1-E321<sup>-</sup> ist hier zur Membran, TREK1-E208<sup>-</sup> hingegen zur Pore orientiert. Die strukturelle Anhäufung der negativen Ladung legt eine sekundäre pH<sub>i</sub>-sensorische Rolle des TREK/TRAAK-konservierten TREK1-E208<sup>-</sup> nahe (Abbildung 17D).

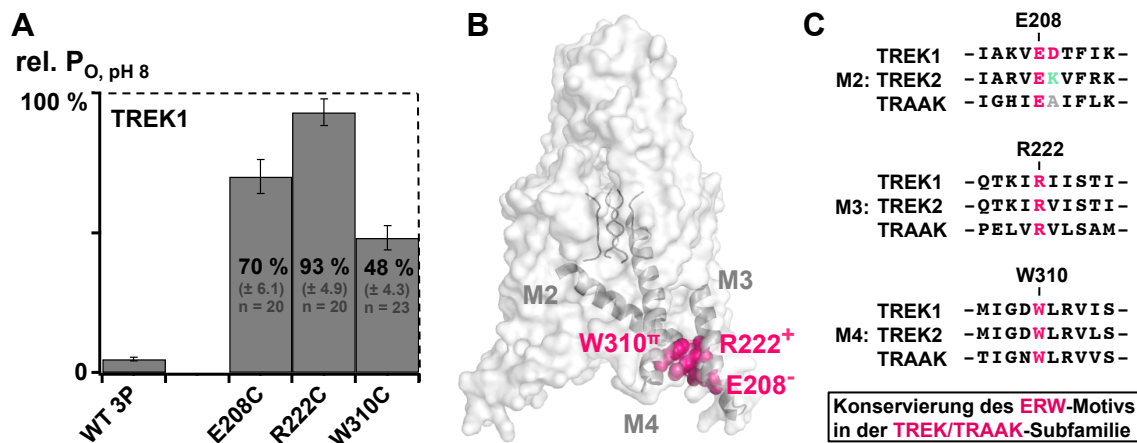
Bei ladungsgleichem Austausch des TREK1-E208<sup>-</sup> gegen Aspartat (E208D<sup>-</sup>, TREK1, Abbildung 17F) blieb die Gatingfunktion des Kanals erhalten, vergleichbar dem -E321D<sup>-</sup> (Abbildung 15F+H). Wie der C-terminale pH<sub>i</sub>-Sensor TREK1-E321<sup>-</sup>, ist das TREK1-E208<sup>-</sup> innerhalb der TREK/TRAAK Subfamilie konserviert (Abbildung 17D). Wohingegen die benachbarten Aminosäuren (Analog TREK1-D209<sup>-</sup>) in ihren Eigenschaften von anionisch (TREK1, -D<sup>-</sup>, rot), über positiv geladen (TREK2, -K<sup>+</sup>, grün) zu ungeladen (TRAAK, -A, grau) variieren. Im basisch aktivierten TRAAK-Kanal stieg die relative basale Offenwahrscheinlichkeit nach Cystein-Austausch des TRAAK-E154<sup>-</sup> auf 80 % ( $\pm 2.7$ , n = 9, TREK1-E208<sup>-</sup>-Analogon) im Vergleich zum nativen Kanal mit 2 % ( $\pm 0.5$ , n = 10, Abbildung 12) Grundaktivität bei pH<sub>i</sub> 6. Daher scheint auch hier das konservierte Glutamat eine essentielle, regulatorische Rolle einzunehmen, welche es zu untersuchen galt.



**Abbildung 17:** Die pH<sub>i</sub>-sensorischen Bereiche des TREK1-Kanals. **A:** Stromantworten nach Cystein-Substitution des C-terminalen Glutamat-Bündels aus TREK1-E320<sup>-</sup>, -E321<sup>-</sup> und -E324<sup>-</sup>, mit völligem Gatingverlust nach Substitution des primären pH<sub>i</sub>-Sensors TREK1-E321<sup>-</sup> (mitte, rot). **B:** Relative basale Offenwahrscheinlichkeit des C-terminalen Glutamat-Bündels, sowie von TREK1-E208<sup>-</sup> (rot) und D209<sup>-</sup> (violett) im Balkendiagramm. **C:** Lokalisation von primären (C-Terminus) und sekundären (M2-M3-Übergang) pH<sub>i</sub>-Sensorbereichen in intrazellulärer Porenansicht und Frontalebene des TREK1-Strukturmodells (PDB-ID: 6cq6, [Lolicato et al., 2017]), mit TREK1-E320<sup>-</sup> (schwarz), den Sensoren TREK1-E321<sup>-</sup> und -E208<sup>-</sup> (rot), sowie -E324<sup>-</sup> und -D209<sup>-</sup> (violett). **D:** Sequenzvergleich der primären und sekundären Sensorbereiche innerhalb der TREK/TRAAK-Subfamilie zeigt die Konservierung beider pH<sub>i</sub>-Sensoren. **E:** Stromantwort nach nahezu vollständigem Verlust des pH<sub>i</sub>-Gatings durch Cystein-Substitution des sekundären pH<sub>i</sub>-Sensors TREK1-E208<sup>-</sup>, sowie intaktes Gatingverhalten nach ladungsgleichem TREK1-E208<sup>-</sup>-Austausch gegen Aspartat (D<sup>-</sup>). **F:** Stromantwort auf basischen pH-Wert des dauerhaft aktiven TRAAK-E154C nach Cystein-Austausch des TREK/TRAAK konservierten Glutamates (Analog TREK1-E208<sup>-</sup>) des M2-M3-Überganges.

### 3.2.2 Die Interaktionstriade der Porensegmente M2, M3 und M4

Ein Vergleich von Sequenzen, Struktur und elektrophysiologisch gewonnenen Daten offenbarte zwei in der TREK/TRAAK-Subfamilie konservierte Seitenketten mit stark erhöhter Grundaktivität in unmittelbarer Nähe des sekundären  $\text{pH}_i$ -Sensors TREK1-E208<sup>-</sup> (Abbildung 18). Zusammen bilden diese drei Seitenketten eine Interaktionstriade, welche die Segmente M2 (TREK1-E208<sup>-</sup>), M3 (TREK1-R222<sup>+</sup>) und M4 (TREK1-W310), innerhalb einer TREK1-Untereinheit, in gesenkter Helixkonformation stabilisieren (Abbildung 18B, rot).

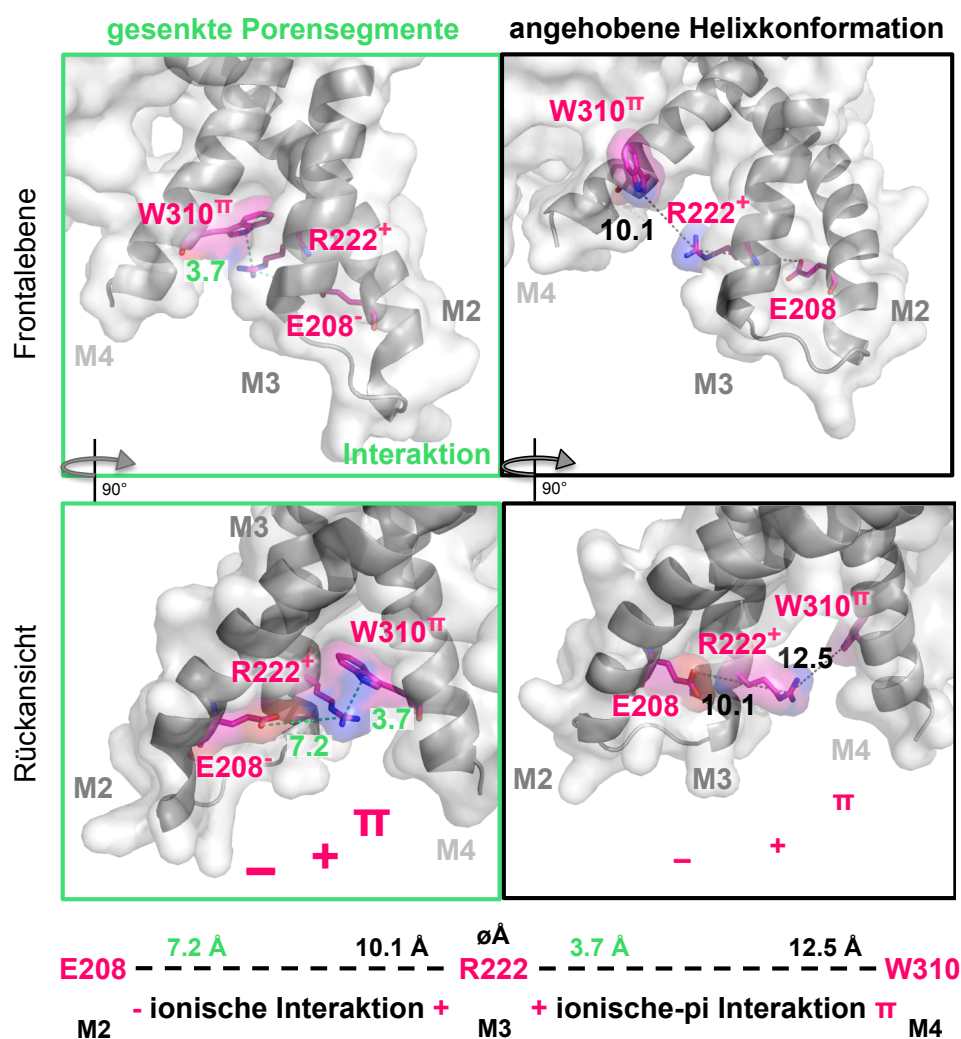


**Abbildung 18:** Substitution nach Cystein in der strukturellen Umgebung der E208<sup>-</sup> enthüllte eine kritische und TREK/TRAAK spezifische Aminosäuretriade. **A:** Stark erhöhte rel.  $P_O$  der TREK1-E208C, -R222C und -W310C im Balkendiagramm. **B:** Lokalisation der ERW-Interaktionstriade im TREK-Strukturmodell (PDB-ID: 4XDJ [Dong et al., 2015]) **C:** Sequenzvergleich dieser TREK/TRAAK-konservierten Seitenketten.

Der Austausch des konservierten Tryptophans TREK1-W310 durch Cystein erhöhte die basale relative Offenwahrscheinlichkeit des Kanals auf 48 % ( $\pm 4.3$ ,  $n = 23$ , M4, Abbildung 18A). Cystein-Substitution des medialen, positiv geladenen R222<sup>+</sup> destabilisierte den Kanal bis zum Gatingverlust mit einer relativen  $P_O$  von 93 % ( $\pm 4.9$ ,  $n = 20$ , M3, Abbildung 18A), sodass eine  $\text{pH}_i$ -induzierte Inaktivierung des TREK1-Kanals nicht mehr möglich war. TREK1-E208<sup>-</sup> und TREK1-R222<sup>+</sup> sind überdies in weiteren  $\text{K}_2\text{P}$ -Kanälen konserviert. Das Tryptophan TREK1-W310 ist dagegen einzig innerhalb der TREK/TRAAK Subfamilie vertreten und findet sich in keinem weiteren  $\text{K}_2\text{P}$ -Kanal. Diese domänenübergreifende Interaktionstriade ist demnach ein gemeinsames und spezifisches Merkmal der TREK/TRAAK-Subfamilie.

Abbildung 19 gibt einen Einblick in die Lokalisation dieser drei Aminosäuren in den beiden postulierten Zuständen der TREK2-Modelle (PDB-ID: 4XDJ/4BW5 [Dong et al.,2015]). In der gesenkten Helixkonformation (Abbildung 19, grün) liegen die drei Seitenketten nahe beieinander. Mittlere Abstände von 7.2 (E208 - R222) und 3.7 Å (R222 - W310) weisen auf eine stabilisierende Interaktion hin, welche in der gehobenen Anordnung der Porensegmente (Abbildung 19, schwarz), mit Abständen von 10.1 (E208 - R222) und 12.5 Å (R222 - W310), nicht mehr möglich ist.

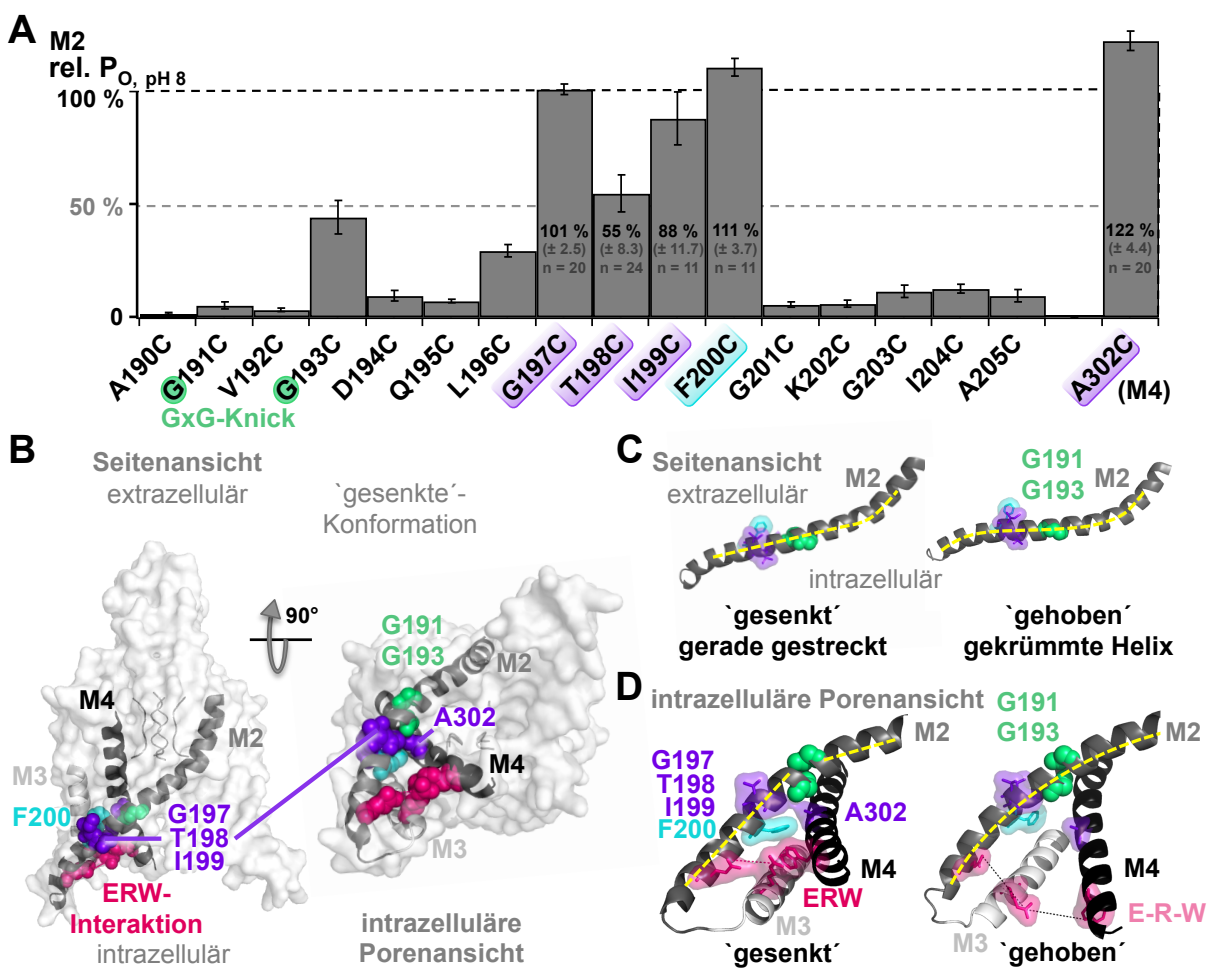
Die Destabilisierung des inaktiven Grundzustandes durch Cystein-Austausch, festgestellt anhand der relativen  $P_O$  der konstitutiv geöffneten Kanäle der mutierten ERW-Triade (Abbildung 18A) impliziert, dass der inaktive Zustand von TREK/TRAAC-Kanälen der gesenkten Helixkonformation ähnelt (Abbildung 19, grün), wohingegen der aktive Zustand der gehobenen Konformation entspricht (Abbildung 19, schwarz).



**Abbildung 19:** Lage und Interaktionsabstände der ERW-Domänentriade in Frontal- (Vergößerung aus Abbildung 18B) und Rückansicht in den TREK2-Strukturmodellen (PDB-ID: 4XDJ/4BW5, [Dong et al.,2015]). Mittlere Abstände von 7.2 (E208-R222, rot) und 3.7 Å (R222-W310, rot) deuten auf eine ionische (-/+) -pi- ( $\pi$ ) Interaktion der drei Seitenketten in der gesenkten Helixkonformation (links, grün). Die Seitenkettenorientierung und Abstände von 10.1 (E208-R222, schwarz) und 12.5 Å (R222-W310, schwarz) schließen eine ERW-Interaktion in gehobener Konformation (rechts) aus.

### 3.2.3 Die kritische Region unterhalb des Glycin-Knicks des M2-Segmentes

Im Vergleich von Struktur und elektrophysiologischen Daten zeigte sich ein Bündel von fünf Cystein-substituierten Seitenketten stark erhöhter Grundaktivität unmittelbar oberhalb der stabilisierenden ERW-Triade (Abbildung 20A+B). Das Bündel ist direkt unterhalb des M2-GxG-Knicks (grün, Abbildung 20C+D) lokalisiert, welcher schon von Lolicato et al. als Ausgangspunkt einer M2-Rotation am TRAAK-Kanal beschrieben wurde [Lolicato et al.,2014]. Drei der fünf Seitenketten sind hierbei membran- oder cytosolisch orientiert. Die Mutationen an F200 und A302 (Abbildung 20A) zeigten hier die größten Wirkungen mit relativen  $P_O$ -Werten von 111 % ( $\pm 3.7$ ,  $n = 11$ , F200C) und 122 % ( $\pm 4.4$ ,  $n = 20$ , A302C) und die Seitenketten eine proteinorientierte Ausrichtung (Abbildung 20D). Die Lageveränderung des M2-Segmentes von gerader Ausrichtung in gesenkter (links) zu gekrümmter Segmentanordnung in der gehobenen Helixkonformation (rechts) zeigt Abbildung 20C.



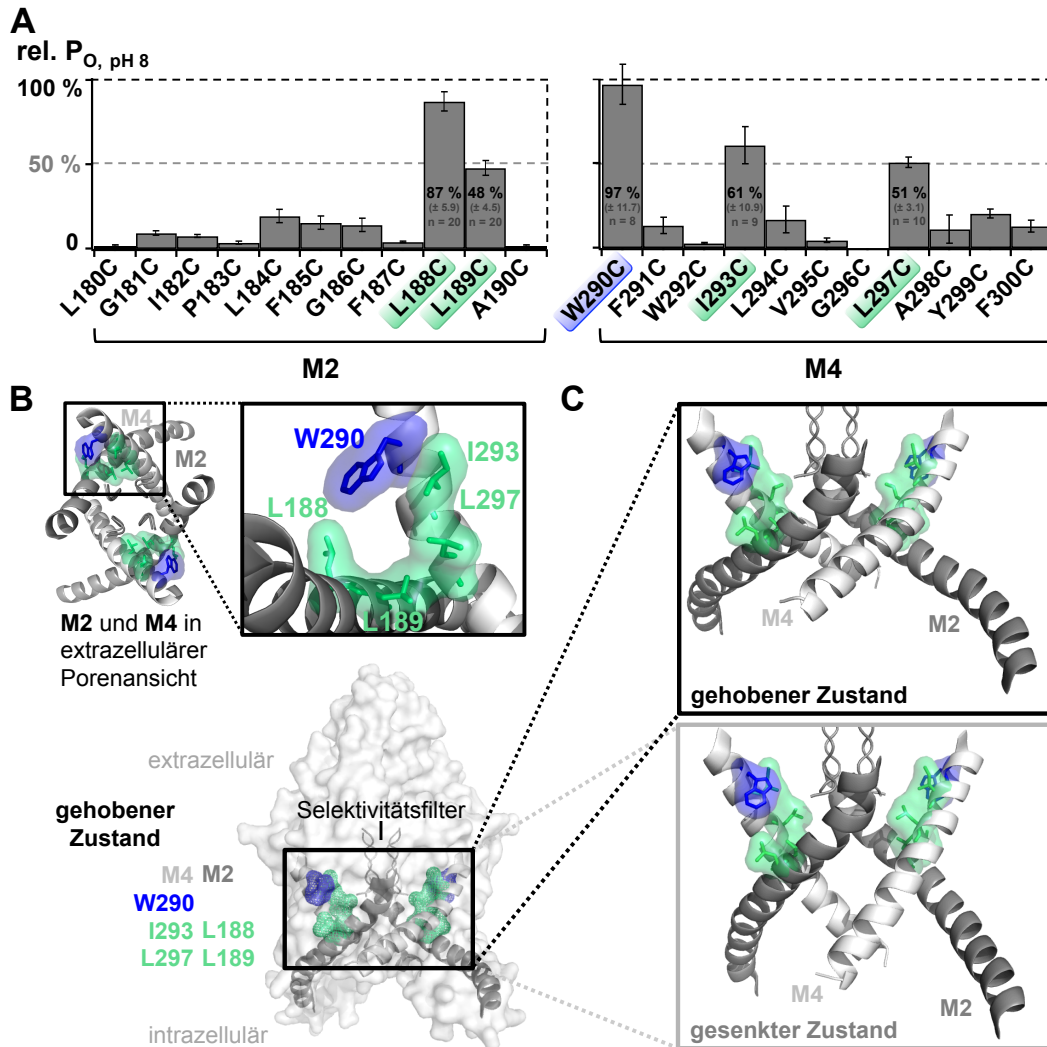
**Abbildung 20:** Das kritische Bündel um TREK1-F200 oberhalb der ERW-Dömänentriade zeigte Verlust der Gating-funktion nach Cystein-Austausch. **A:** rel.  $P_O$ -Statistik abwärts des 'GxG-Knicks' (TREK1-G191/x/G193). **B:** Lokalisation von TREK1-F200 (cyan) sowie der ERW-Triade (rot) und der kritischen Seitenketten TREK1-G197, -T198, -I199 (M2, violett), sowie A302 (M4, violett) und G191 und G193 (grün) im Strukturmodell in frontalebene- und intrazellulärer Porenansicht (PDB-ID: 4XDJ [Dong et al.,2015]). **C:** Gerade ausgerichtetes M2-Segment in gesenkter Helixkonformation (links) und dessen Krümmung durch Aufwärtsbewegung in die gehobene Helixkonformation (rechts). **D:** Vergrößerung der kritischen Seitenketten (violett) unterhalb des GxG-Knicks (grün) in intrazellulärer Porenansicht (links: gesenkte, rechts: gehobene Struktur, analog zu C, PDB-ID: 4XDJ/4BW5 [Dong et al.,2015]).

Knapp 10 % der insgesamt 82 untersuchten Aminosäuren der Porenhelices waren Phenylalanine und somit, nach Glycin, Isoleucin und Leucin, die meist vertretene Aminosäure in den untersuchten Regionen der Porensegmente M2, M3 und M4. Mit Ausnahme des TREK1-F200C, zeigten Cystein-Substitutionen der sterisch anspruchsvollen Phenylalanine kaum eine Veränderung der Grundaktivität (Abbildung 14), womit TREK1-F200C eine Sonderstellung einzunehmen scheint.

Eine Überprüfung der Proteinstruktur offenbarte die Position des TREK1-F200 (M2) inmitten der Porensegmente M3 und M4, eine Ebene oberhalb der ERW-Triade (Abbildung 20B). Die stark erhöhten Grundaktivitäten nach Cystein-Austausch der strukturellen Umgebung von TREK1-F200 mit basalen relativen Offenwahrscheinlichkeiten des TREK1-G197C von 101 ( $\pm 2.5$ ,  $n = 20$ ), des -T198C von 55 ( $\pm 8.3$ ,  $n = 24$ ) und des -I199C von 88 % ( $\pm 11.7$ ,  $n = 11$ ), sowie des TREK1-A302C von 122 % ( $\pm 4.4$ ,  $n = 20$ , M4), markierten diese Porenregion als kritischen Lokus der Gatingfunktion (Abbildung 20A, violett hinterlegt). Bestätigt wurde diese Annahme durch die kürzliche Veröffentlichung der Bindungsstelle des Anästhetikums Isofluran an eben diesen Seitenketten des TREK1-Kanals ([Wague et al., 2020]). Eine stabilisierende Rolle des TREK1-F200 bei der Segmentausrichtung war somit eine naheliegende Vermutung, welche es zu prüfen galt.

#### 3.2.4 Die Umgebung des Selektivitätsfilters

Fünf Cystein-Mutationen im unteren Umfeld des TREK1-Selektivitätsfilters zeigten ebenfalls kritisches Verhalten. Die relative Offenwahrscheinlichkeit des TREK1-W290C lag bei 97 % ( $\pm 4.1$ ,  $n = 8$ , Abbildung 21A, blau, Analog zu [Lolicato et al., 2014]) und des -L188C bei 87 % ( $\pm 7.0$ ,  $n = 20$ , Abbildung 21A, M2, grün). Die Kanäle TREK1-L189C, -I293C und -L297C zeigten mit 48 ( $\pm 4.5$ ,  $n = 20$ , Abbildung 21A, M2, grün), 61 ( $\pm 10.9$ ,  $n = 9$ , Abbildung 21A, M4, grün) und 51 % ( $\pm 3.1$ ,  $n = 10$ , Abbildung 21A, M4, grün) ebenfalls deutliche Effekte. Die Lokalisation und Filterorientierung dieser Aminosäuren legt eine Stabilisierung der unteren Selektivitätsfilterregion durch die ersten Windungen der M4-Helix, bis hin zur M2-M4-Überkreuzung unterhalb des Selektivitätsfilters nahe (Abbildung 21B). Ein Vergleich von gesenkter (grau) und gehobener (schwarz) Helixkonformation zeigte lediglich geringfügige strukturelle Veränderungen dieser Seitenketten (Abbildung 21C).



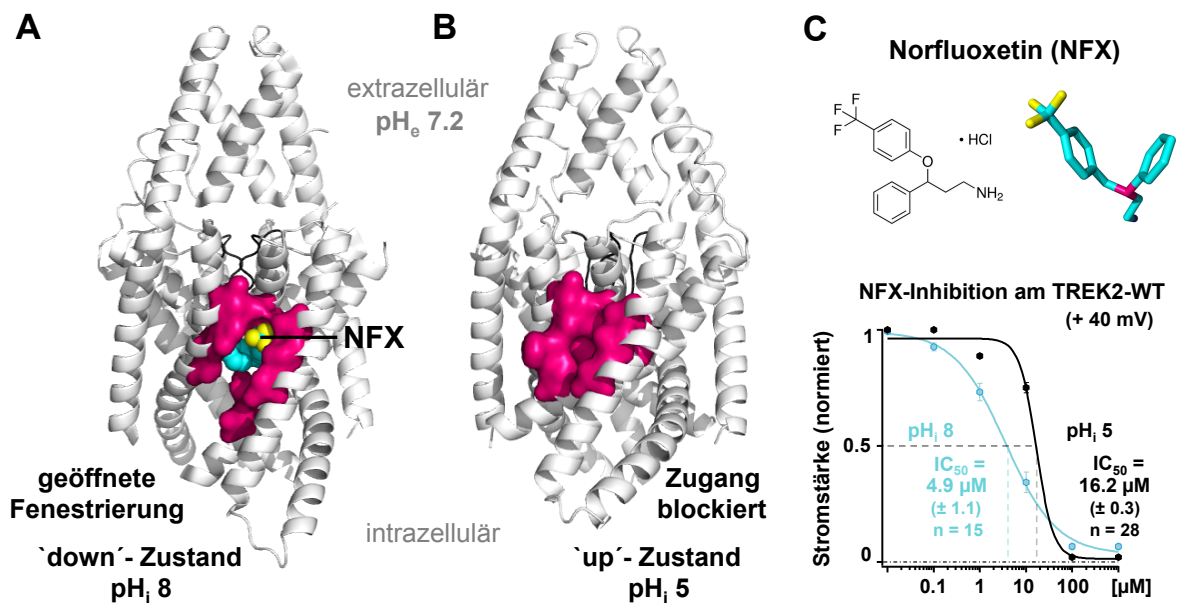
**Abbildung 21:** Kritische Cystein-Mutationen im Umfeld des Selektivitätsfilters,  $P_O$ -Auswertung und Lokalisation im TREK-Kanal. **A:** L188C und L189C (M2), sowie I293C und L297C (M4) zeigten jeweils starke Destabilisierung der Grundzustände mit basalen rel.  $P_O \geq 50\%$  (grün). Die hohe Grundaktivität des TREK1-W290C (blau, rel.  $P_O \approx 97\%$ ) weist auf völligen Verlust der Funktionsfähigkeit des Kanals. **B:** Lage der fünf Seitenketten in der Frontalansicht des Strukturmodelles (unten), sowie in M2 und M4 in extrazellulärer Porenansicht (oben, PDB-ID: 4XDJ [Dong et al.,2015]). **C:** Ein Vergleich von gehobener und gesenkter Helixkonformation zeigt lediglich geringe Lageveränderungen der Seitenketten um den unteren Bereich des Selektivitätsfilters (PDB-ID: 4BW5/4XDJ [Dong et al.,2015]).

Die Daten des Cystein-Scans identifizierten kritische Regionen des TREK1-Kanals, mit Filterumgebung, F200-Lokus, ERW-Triade und Protonensensor TREK1-E321<sup>-</sup>. Die Vorgänge während der Kanalregulation bleiben dabei allerdings noch weitgehend ungeklärt. Die Übertragung des Signals einer  $pH_i$ -Aktivierung auf den regulierenden Selektivitätsfilter über die Bewegung der Porensegmente sollte nun anhand von Lageveränderungen der Seitenketten im Zustand der Aktivierung überprüft werden. Abgeschränkte Seitenketten sind schlecht oder gar nicht zugänglich, wohingegen frei liegende Cystein-Seitenketten modifiziert werden können. Ein Vergleich der Erreichbarkeit der eingeführten Cysteine im leitenden Zustand und inaktiven Kanal gibt somit Aufschluss über die stimulationsbedingte Lageveränderung der substituierten Seitenketten.



### 3.3 Die $pH_i$ -induzierten Porensegmentbewegungen

Zusätzlich zu den hier bereits vielfach gezeigten Kristallstrukturen des TREK2-Proteins in gesenkter und gehobener Helixkonformation (PDB-ID: 4BW5/4XDJ [Dong et al.,2015]) wurde durch Dong et al. ein Protein-Ligand-Komplex des TREK2-Kanals mit dem inhibierenden Fluoxetin-Derivat Norfluoxetin (NFX) kristallisiert und die Struktur zur Aufklärung der NFX-Bindungsstelle aufgelöst. Die Kristallstruktur zeigt die Lokalisation des NFX tief in der seitlichen Membran-Fenestrierung des TREK2-Kanals unterhalb des Selektivitätsfilters (Abbildung 22A, PDB-ID: 4XDK [Dong et al.,2015]).



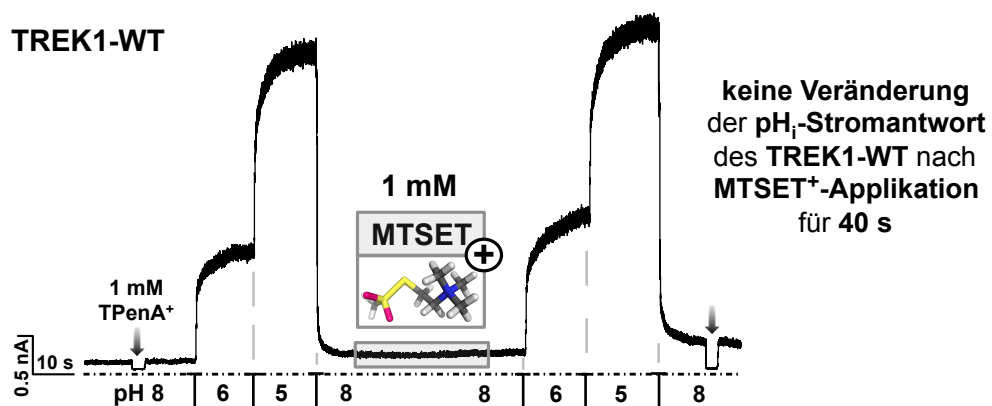
**Abbildung 22:** Die seitliche Membran-Fenestrierung des gesenkten Kanal-Zustandes fungiert als NFX-Bindungstasche. **A:** Beteiligte Seitenketten (rot) der Bindungsregion von Norfluoxetin (NFX) im TREK2-Kanal (PDB-ID: 4XDK [Dong et al.,2015]). **B:** Direkter Vergleich zu gehobener Konformation der Helices mit geschlossener Fenestrierung (rot, PDB-ID: 4BW5 [Dong et al.,2015]). **C:** Die sterische Hinderung der NFX-Bindung durch Anheben der Helices via  $pH_i$ -Aktivierung zeigte sich in der Verringerung der Bindungsaffinität des NFX von  $IC_{50} = 4.9_{pH_i 8}$  auf  $16.1_{pH_i 5} \mu M$  ( $U = +40$  mV). Zudem Darstellung von Strukturformel und räumlicher Ausdehnung des NFX-Moleküls (oben).

Der im Rahmen dieser Arbeit ermittelte  $IC_{50}$ , also die Konzentration halbmaximaler Inhibition durch NFX, verschob sich nach  $pH_i$  5-Aktivierung von  $4.9 (\pm 1.1, n = 15)$  zu  $16.2 \mu M (\pm 0.3, n = 28)$ , Abbildung 22C). Diese Verschiebung zu höheren Konzentrationen bedeutet eine Affinitätsverringering für NFX und suggeriert eine schlechtere Zugänglichkeit zur Bindungsstelle, möglicherweise über das Schließen der Membran-Fenestrierung durch  $pH_i$ -induzierte Porensegmentbewegungen des TREK2-Kanals.

Einblicke in die Vorgänge während dieses Übergangs, gewährt die detaillierte Untersuchung der Porensegmente des Kanalproteins mittels MTS-Verbindungen.

### 3.3.1 Die Analyse der $pH_i$ -induzierten Poresegmentbewegungen des TREK1-Kanals

Die irreversible Modifikation von Cysteinen durch MTS-Verbindungen ist ein bewährtes Mittel zur Analyse von Zugänglichkeiten einzelner Aminosäure-Seitenketten innerhalb von Proteinstrukturen. Der Aufbau von  $K_{2P}$ -Kanälen, aus zweimal der gleichen Untereinheit, führt zur Einführung von zwei Cysteinen pro Dimer. Das hier gewählte Methanthiosulfonat  $MTSET^+$  bringt demnach zwei positive Ladungen in das Protein ein, deren Wechselwirkungen durch Analyse der Stromantworten der modifizierten Cystein-Seitenketten sichtbar werden können. Die Applikation von 1 mM  $MTSET^+$  auf den TREK1-WT-Kanal führte zu keiner Veränderung der Stromantwort des Kanalproteins (Abbildung 23). Für  $MTSET^+$  erreichbare, Cystein-mutierte Seitenketten zeigten hingegen klare Veränderungen.

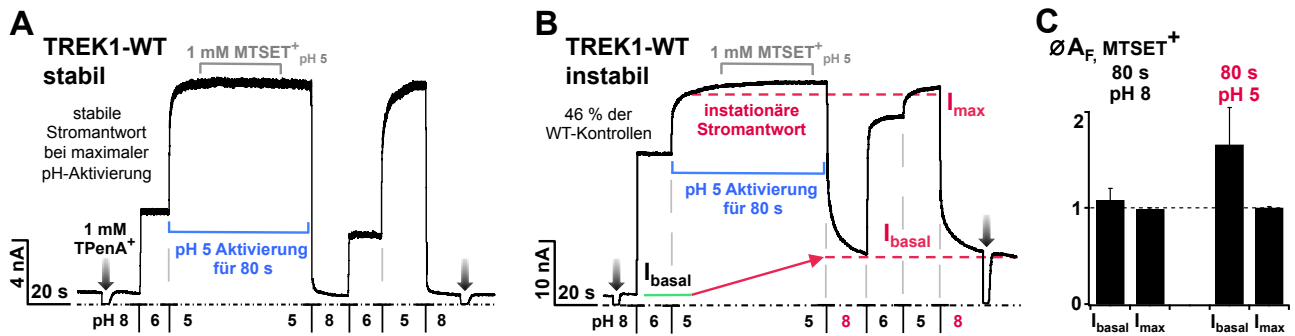


**Abbildung 23:** Applikation von 1 mM  $MTSET^+$  auf die Cystein-freie Pore des TREK1-WT induzierte keine Veränderung der Stromantwort auf  $pH_i$  8, 6 und 5.

Ein Vergleich der  $MTSET^+$ -Modifikation in inaktivem ( $pH_i$  8) und aktivem Zustand ( $pH_i$  5) erbringt Hinweise auf eine potentielle Abschirmung der Cystein-Seitenketten durch strukturelle Veränderungen während einer  $pH_i$ -Aktivierung. Eine Modifikation des TREK1-WT blieb auch im Falle der Applikation von 1 mM  $MTSET^+$  auf den aktivierten Kanal aus (Abbildung 24A). Die dauerhafte Stimulation durch  $pH_i$  5 (80 s) zeigte jedoch ein variables Antwortverhalten, dessen Grund bisher ungeklärt ist. In 46 % der TREK1-WT-Experimente kam es zu einer irreversiblen Stromzunahme (Abbildung 24B,  $I_{max}$ ), welche den Kanal dauerhaft destabilisierte. Die  $pH_i$ -induzierten Stromantworten aus  $pH_i$  8 und 6 waren dabei in noch stärkeren Maße betroffen, wodurch sich die relative basale Offenwahrscheinlichkeit dieser Kanäle erhöhte.

Die nahezu linearen, irreversiblen Stromzunahmen durch  $pH_i$  5 ließen sich, durch Fehlen eines klaren Modifikationsverlaufes (keine sichtbare Reaktion zum Zeitpunkt der Applikation des  $MTSET^+$ , Abbildung 24B), unregelmäßiges Auftreten und stark variierende Ausprägungen, gut von Modifikationen unterscheiden.

Die gestiegene basale Offenwahrscheinlichkeit spiegelt sich im folgenden im Aktivierungsfaktor des Basalstroms wieder, welcher den Strom vor und nach der  $MTSET^+$ -Applikation miteinander vergleicht. Im Falle des TREK1-WT-Kanals ergab sich ein mittlerer Aktivierungsfaktor des Basalstroms von  $1.7 (\pm 0.4, n = 11, \text{Abbildung } 24C)$  nach  $MTSET^+$ -Applikation bei  $pH_i$  5. Die Aktivierungsfaktoren, der von einer  $pH_i$  5-Destabilisierung betroffenen Cystein-Seitenketten, lagen zumeist im Bereich der Abweichung des TREK1-WT-Kanals (Toleranzbereich).



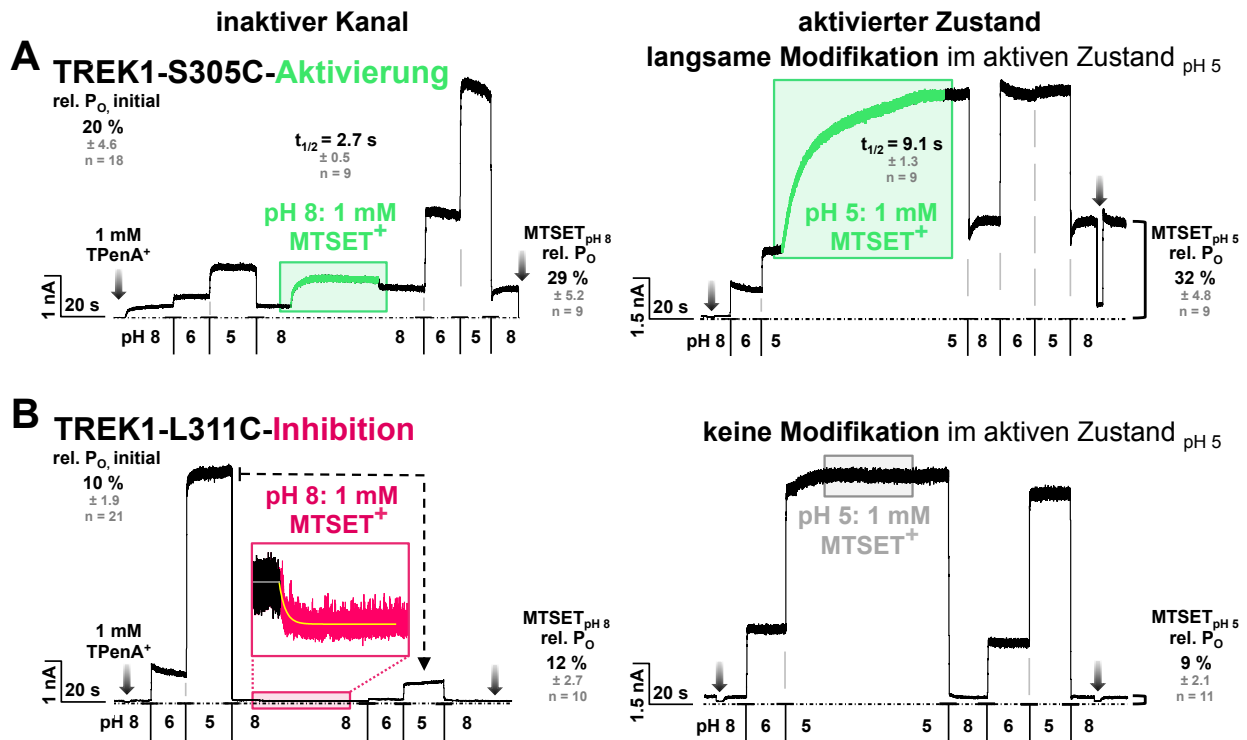
**Abbildung 24:** Eliminierung falsch positiver Ergebnisse ohne klaren Modifikationsverlauf. **A:** Stabile Stromantwort des TREK1-WT nach  $pH_i$  5-Aktivierung für 80 s und Applikation von 1 mM  $MTSET^+$  ( $pH_i$  5). **B:** Lange Stimulierung durch aziden  $pH_i$  (80 s) induzierte Instationarität der Ströme zahlreicher Mutanten, wie auch in 46 % der Messungen des nativen TREK1-Kanals. Eine instationäre Stromantwort steigerte die Maximal- ( $I_{max}$ ) und in stärkerem Maße die Basalströme ( $I_{basal}$ ) der Kanäle (rot). **C:** Mittelung aller Experimente verminderte den methodischen Fehler aus instabilen Messungen und ergab einen mittleren  $A_F$  des Basalstroms von  $1.7 \pm 0.4$  ( $n = 11$ , rot) im Falle des TREK1-WT-Kanals nach 80 s  $pH_i$  5-Stimulation.

### 3.3.2 Die Modifikationsvarianten Cystein-substituierter TREK1-Kanäle

Die Effekte der  $MTSET^+$ -Modifikation auf die einzelnen Cystein-Mutationen des TREK1-Kanals waren sehr heterogen. Abbildung 25 zeigt Beispiele für die variierenden Einflüsse des  $MTSET^+$  auf die einander nah lokalisierten Mutationen TREK1-S305C und TREK1-L311C.

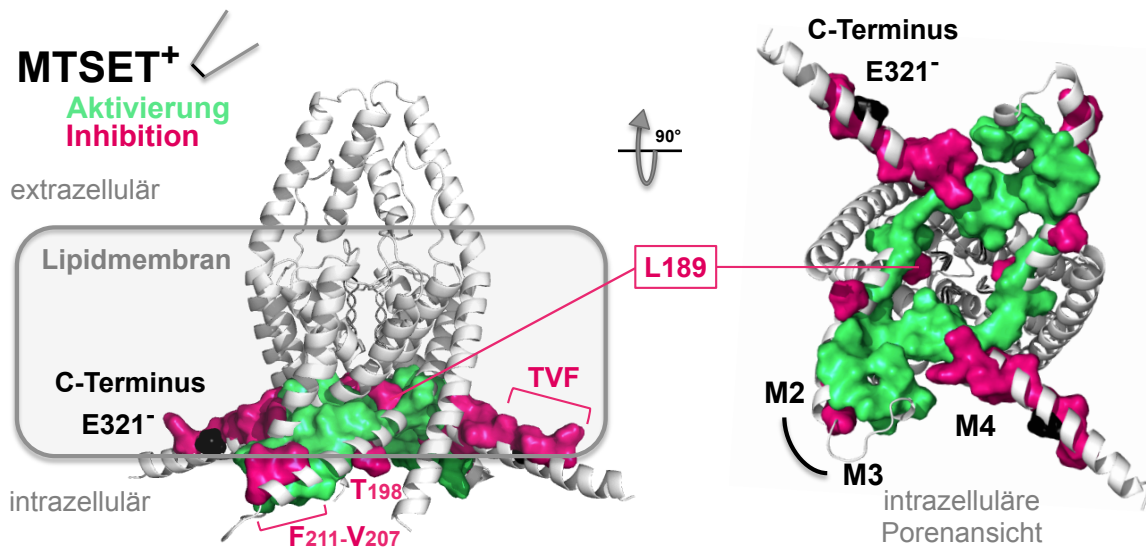
Die Substitution nach Cystein am TREK1-S305 erhöhte die basale relative Offenwahrscheinlichkeit des TREK1-Kanals von  $5 (\pm 0.69, n = 29, \text{Abbildung 14})$  auf  $20\% (\pm 4.6, n = 18, \text{Abbildungen 14 und 25A})$ . Wobei die gemessene Grundaktivität hier abhängig von der Expression der Kanäle war. Je größer der Gesamtstrom, desto höher die Grundaktivität dieser Kanäle. Dieses Phänomen kann gegenwärtig nicht erklärt werden.

Applikation von  $MTSET^+$  auf den inaktiven oder aktivierten Kanal steigerte die  $pH_i$ -induzierten Stromantworten des TREK1-S305C etwa im gleichen Maße und mit jeweils exponentieller Modifikationsrate (Abbildung 25A). Die stets stärkere Steigerung des Basalstromes ( $I_{pH_i 8}$ ), gegenüber der geringeren Zunahme des Maximalstromes ( $I_{pH_i 5}$ ), resultierte in einer gesteigerten basalen relativen Offenwahrscheinlichkeit von  $29\% (\pm 5.2, n = 9, \text{Abbildung 25A, links})$  nach  $MTSET^+$ -Modifikation aus  $pH_i 8$ , beziehungsweise  $32\% (\pm 4.8, n = 9, \text{Abbildung 25A, rechts})$  aus  $pH_i 5$ . Auffällig war hier vor allem die Verlangsamung der Modifikationsgeschwindigkeit von  $t_{1/2} = 2.7 \text{ s} (\pm 0.5, n = 9, pH_i 8, \text{Abbildung 25A, links})$  auf  $9.1 \text{ s} (\pm 1.3, n = 9, pH_i 5, \text{Abbildung 25A, rechts})$  im  $pH_i$ -aktivierten Zustand des TREK1-S305C, dies deutet auf eine verschlechterte Zugänglichkeit der Seitenkette. Im Falle des TREK1-L311C war der  $pH_i$ -Wert während der Applikation hingegen entscheidend für die Modifizierbarkeit der eingeführten Cysteine. Eine Modifikation durch  $MTSET^+$  entfiel bei hoher Protonenkonzentration ( $pH_i 5, \text{Abbildung 25B, rechts}$ ), wohingegen die Stromantworten nach einer Applikation bei einem  $pH_i$ -Wert von 8 drastisch reduziert waren (Abbildung 25A, links). Der Strom nahm hierbei auf etwa  $20 (I_{max, pH_i 5})$  bis  $27\% (I_{basal, pH_i 8})$  der ursprünglichen Stromstärke ab. Die einheitliche Inhibition der Stromantwort ( $I_{nA, pH_i 8, 6 \text{ und } 5}$ ) des TREK1-L311C veränderte dabei nicht das nahezu native  $pH_i$ -Verhalten, mit einer initialen, relativen  $P_{O, pH_i 8}$  von  $10\% (\pm 1.9, n = 21, \text{Abbildung 14 und 25B})$ . Das Ausbleiben einer Modifikation durch  $MTSET^+$ -Applikation bei  $pH_i 5$  deutet auf eine sterische Abschirmung dieser Seitenkette im aktivierten Zustand des Kanalproteins und demnach auf eine signifikante Bewegung der TREK1-L311C-Seitenkette während einer  $pH_i$ -Aktivierung.



**Abbildung 25:** Modulation der Ströme von TREK1-S305C und -L311C über MTSET<sup>+</sup>-Modifikation. **A:** 1 mM MTSET<sup>+</sup> modifizierte TREK1-S305C im inaktiven ( $pH_i$  8, links), wie auch im aktiven Kanalzustand ( $pH_i$  5, rechts), mit jeweils exponentieller Modifikationsrate. Die Modifizierung dauerte im aktivierten Zustand etwa dreifach länger ( $t_{1/2}$ ,  $pH_i$ ). **B:** absolut  $pH_i$ -abhängige Modifikation von TREK1-L311C mittels MTSET<sup>+</sup>. Links: Inhibition des TREK1-L311C erfolgte aus inaktivem  $pH_i$  8-Zustand des Kanals, ohne signifikante Veränderung der relativen Offenwahrscheinlichkeit (rel.  $P_O$ ). Rechts: MTSET<sup>+</sup>-Applikation aus  $pH_i$  5 führte zu keiner Änderung der Stromantwort.

Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse der MTSET<sup>+</sup>-Experimente aller drei Porensegmente im Strukturmodell des TREK1-Kanals (PDB-ID: 6cq6, [Lolicato et al., 2017]). Durch MTSET<sup>+</sup> aktivierbare Cystein-Seitenketten sind dabei grün dargestellt und Teil der Kanalpore. Inhibitorisch modifizierte Seitenketten (rot) sind dagegen vorwiegend am Porenrand und somit an den Grenzflächen zur Membran oder auch der cytosolischen Wasserphase lokalisiert. Ausnahme ist hier nur das TREK1-L189C (Abbildung 26), welches in der Ebene unterhalb des Selektivitätsfilters und somit innerhalb der Pore lokalisiert ist. Die übrigen inhibitorisch-modifizierbaren Mutationen des M2-Segmentes befinden sich, wie im proximalen C-Terminus, jeweils an einer Threonin- (T), Valin- (V) und Phenylalanin-Position (F, Abbildung 26, links), wenn auch das TREK1-T198C hier in deutlicher Entfernung zur V207C-F211C-Lokalisation gelegen ist. Im C-Terminus liegen die Seitenketten dagegen in helicaler Anordnung, als inhibitorisch-modifizierbares TVF-Motiv zusammen mit TREK1-S315C, unmittelbar hintereinander. Eine Reihe von Stichproben mit MTSES<sup>-</sup> als modifizierendem Reagenz lieferte qualitativ und quantitativ sehr ähnliche Ergebnisse. Eine Abhängigkeit des Modifikationseffektes von der Art der Ladung war daher auszuschließen. Zusammenfassend lässt eine Modifikation durch doppelte Einführung geladener MTS-Moleküle innerhalb der Kanalpore im Allgemeinen eine Aufweitung der Pore und somit den Übergang in eine, eher gehobene, Helixkonformation höherer Offenwahrscheinlichkeit vermuten. Im Gegensatz dazu sinkt die Offenwahrscheinlichkeit nach der Modifikation an den Grenzen des Kanalpore und deutet so auf etwaige Membraninteraktionen, welche den gesenkten Zustand niedriger Kanalaktivität zu begünstigen scheinen.



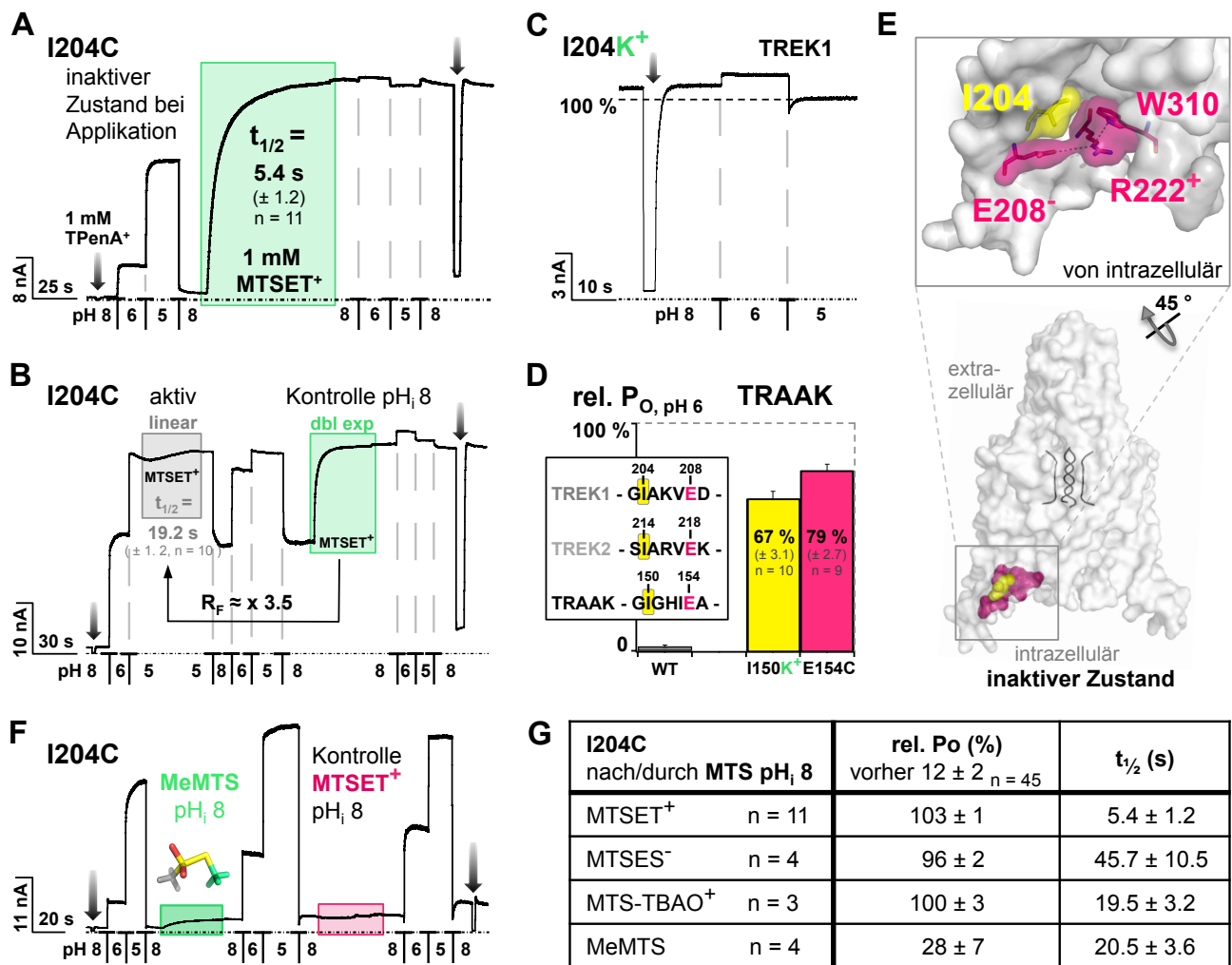
**Abbildung 26:** MTSET<sup>+</sup>-Effekte der modifizierten Cystein-Seitenketten im Strukturmodell (PDB-ID: 6cq6, [Lolicato et al., 2017]). MTSET<sup>+</sup>-Aktivierung (grün) an Mutationen innerhalb der Pore des TREK-Kanals und Inhibition (rot) von vorwiegend an der Lipidmembran lokalisierten Seitenketten, mit dem Protonensensor E321<sup>-</sup> (schwarz), sowie dem inhibitorisch-modifizierten und Selektivitätsfilter-orientierten L189C innerhalb der Pore, in Seitenansicht (links) und mit Blick durch Pore von intrazellulär (rechts).

### 3.3.3 Die Modifikationseffekte auf Cystein-Einzelmutationen der TREK1-Porensegmente

7 mutierte Seitenketten des M2-Segmentes, sowie 5 Mutationen des M4-Segmentes, wurden durch eine Applikation von MTSET<sup>+</sup> im aktivierten  $pH_i$  5-Zustand nicht modifiziert. Wohingegen die Seitenketten im inaktivierten Zustand eine klare Modifikation zeigten, wie am Beispiel der TREK1-L311C (Abbildung 25B) dargestellt. Dieses Ergebnis stach besonders heraus, da ein  $pH_i$ -abhängiger Verlust der MTSET<sup>+</sup>-Modifikation im inaktiven  $pH_i$  8-Zustand nicht beobachtet wurde.

Die  $pH_i$ -Abhängigkeit der Modifikation zeigte aber sich nicht nur im absoluten Verlust der Bindung im  $pH_i$ -5 Zustand ('absolute  $pH_i$ -Abhängigkeit'), sondern zudem in der protonenabhängigen Geschwindigkeit des Modifikationsverlaufes (Rate). Der Ratenfaktor ( $R_F$ ) ergab sich aus dem Quotienten der Zeiten halbmaximaler Modifikation ( $t_{1/2}$ ) und stellt die Verlangsamung der Modifikation aus  $pH_i$  5 gegenüber der prinzipiell schnelleren  $pH_i$  8-Bindung dar. Als Beispiel sei zunächst auf Abbildung 25A zurückverwiesen, welche exemplarische Messungen des TREK1-S305C im inaktiven (links) und aktiven Zustand (rechts) zeigt. Im aktivierten Zustand verlangsamte sich die MTSET<sup>+</sup>-Bindung hier um das dreifache ( $R_{F, S305C} = 3.4$ ).

Die Auswertung der Ratenfaktoren aller untersuchten Cystein-Seitenketten zeigte eine hohe Variabilität und Beschleunigungen der Modifikation auf mehr als das Hundertfache. Die Klassifizierung der Stärke der  $pH_i$ -Abhängigkeit erfolgte anhand der Messergebnisse. Eine Beschleunigung der Modifikation um 50 % ( $R_F > 1.5$ ) wurde als untere Grenze der  $pH_i$ -Abhängigkeit festgelegt und Mutationen mit einem Ratenfaktor von 1.5 bis 3.5 als 'gering  $pH_i$ -abhängig' eingestuft. Cystein-Mutationen mit einem Ratenfaktor von mehr als 3.5 zeigen eine deutliche Veränderung der Modifikation und wurden somit als ' $pH_i$ -abhängig' bewertet. Diese Begrenzung erfolgte ausgehend vom TREK1-I204C-Kanal, den Grund zeigt Abbildung 27.



**Abbildung 27:** Lysin-Mutation und Cystein-Modifikationen an TREK1-I204C destabilisieren die ERW-Interaktion.

**A:** Modifikation durch MTSET<sup>+</sup> aus  $pH_i$  8 mit zweifach-exponentiellem Ratenverlauf (grün). **B:** Verlangsamung zu linear verlaufender Modifikation aus  $pH_i$  5 (grau,  $R_F$  von etwa 3.5) und Modifikationskontrolle mittels MTSET <sub>$pH_i$  8</sub> (grün). **C:** Austausch des TREK1-I204 gegen Lysin öffnet den TREK1-Kanal dauerhaft. **D:** Konservierung und relative Offenwahrscheinlichkeiten der mutierten TREK1-Analoga TRAAK-I150K<sup>+</sup> (gelb) und TRAAK-E154C (rot). **E:** Orientierung und Lage der TREK1-I204 im Strukturmodell (gelb, PDB-ID: 4XDJ [Dong et al., 2015]) inmitten der ERW-Interaktion (rot). **F:** Stromantwort der MeMTS (grün) -Modifikation an TREK1-I204C aus  $pH_i$  8. Die Kontrolle mit MTSET<sup>+</sup> (rot) beweist die Vollständigkeit der Modifikation, mit erhaltener  $pH_i$ -Gatingfunktion. **G:** **Tabelle 1:** Relative Offenwahrscheinlichkeiten und Modifikationsgeschwindigkeiten unter Verwendung verschiedener MTS-Reagenzien.

TREK1-I204C zeigte durch Modifikation im inaktiven Zustand eine sehr potente Aktivierung des Basalstromes um den Faktor 18.9 ( $\pm 5.3$ , n = 11) und eine konstitutive Öffnung des Kanals nach Abschluss der Modifikation. Der Modifikationsverlauf war stets doppelt exponentiell, mit einer mittleren Geschwindigkeit von  $t_{1/2} = 5.4$  s (Abbildung 27A) und lies sich schon optisch klar von der linear verlaufenden  $pH_i$  5-Modifikation unterscheiden (Abbildung 27B, grau). Die Definition der Modifikationsgeschwindigkeit  $t_{1/2}$  bedingt in diesem Fall eine strenge Abhängigkeit des Wertes von der Applikationsdauer. Da der Zeitpunkt der vollständigen Modifikation während der Messung hier schwer zu erkennen und durch lange Applikation bei  $pH_i$  (Abbildung 24B+C) nicht

zuverlässig bestimmbar war, wurde die Applikationsdauer nach Messprotokoll auf 40 s festgesetzt. Die Zeit der halbmaximalen Modifikation ergibt sich so zu etwa 20 s ( $19.2 \text{ s} \pm 1.2$ ,  $n = 11$ ). Abbildung 27B zeigt den  $pH_i$  5-Modifikationsverlauf flacher Steigung (grau). Die Kontrolle durch Applikation von  $MTSET^+$  aus  $pH_i$  8 (grün) beweist die Unvollständigkeit der  $pH_i$  5-Modifikation nach 40 s  $MTSET^+$ -Applikation.

Verzichtet man auf die Modifikation und ersetzt das TREK1-I204 gegen das größere und geladene Lysin, so zeigt sich auch hier eine konstitutive Öffnung des TREK1-Kanals (Abbildung 27C). Eine Untersuchung bestätigte die, aufgrund der Konservierung angenommene, Übertragbarkeit dieser Eigenschaften auf den TRAAK-Kanal, denn sowohl TRAAK-E154C, als auch -I150K zeigten einen Verlust der Gatingfunktion (Abbildung 27D).

Eine Betrachtung der Lage der TREK1-I204 offenbart die Seitenkette inmitten der ERW-Interaktion des gesenkten Zustandes (Abbildung 27E). Eine Destabilisierung dieser Interaktion durch große oder geladene Seitenketten und Substituenten scheint daher sehr wahrscheinlich und konnte durch die Verwendung verschiedener MTS-Reagenzien bestätigt werden ( $MTS-TBAO^+$ : 8-(Tributylammonium)octyl-MTS,  $MTSES^-$ : 2-Sulfonatoethyl-MTS und MeMTS: Methyl-MTS, Abbildung 27F+G). Lediglich unter Verwendung des kleinen und ungeladenen MeMTS blieb die Gatingfunktion mit einer relativen Offenwahrscheinlichkeit von 28 % (Abbildung 27F) erhalten. Eine Kontrolle durch  $MTSET^+$ -Applikation bewies die Vollständigkeit der MeMTS-Modifikation (Abbildung 27G).

Die Tabellen 2 und 3 (Abbildung 28 und 29) beinhalten die Messergebnisse zur  $pH_i$ -Zustandsabhängigkeit der untersuchten Poresegmente, sowie eine Beurteilung jeweiligen Abschirmung der Cystein-Seitenketten mittels dreier Strukturmodelle. Hierzu Dargestellt sind die Aktivierungsfaktoren ( $A_F$ ) der Basalstromveränderung nach Modifikation aus  $pH_i$  8 und  $pH_i$  5. Die Veränderungen der Maximalstromantworten dieser Messreihen finden sich im Anhang (5.2) und zeigen qualitativ ähnliche Ergebnisse, wobei die Modifikationseffekte hier tendenziell weniger ausgeprägt waren.

Die Aktivierungsfaktoren der modifizierbaren Seitenketten sind farblich hervorgehoben, wobei zwischen einer Aktivierung (grün) und Inhibition der Stromantworten (rot) zu unterscheiden ist. Die Abhängigkeit vom  $pH_i$ -Zustand zeigt sich über einen Vergleich der Modifikationsgeschwindigkeiten  $t_{1/2}$  beider Zustände. Der Ratenfaktor  $R_F$  gilt, als Quotient aus  $t_{1/2, pH_i 5}$  und  $t_{1/2, pH_i 8}$ , als Maß für die Beschleunigung der Modifikation aus  $pH_i$  8, gegenüber der stets langsameren  $pH_i$  5-Modifikation. Eine quantitative Bewertung der  $pH_i$ -Zustandsabhängigkeit entfiel für die 12 Cystein-Seitenketten, welche trotz klarer Modifizierbarkeit aus  $pH_i$  8, keine Veränderung der Stromantworten nach  $MTSET^+$ -Applikation aus pH 5 zeigten. Diese, als absolut zustandsabhängig klassifizierten Mutationen wurden in den Tabellen 2 und 3 mit gelben Balken hervorgehoben.

Um diese Daten nun bewerten zu können, wurde mittels der Software PyMol die für Wasser zugängliche Oberfläche 'RASA' (Relative Accessible Surface Area) einer Seitenkette in % berechnet und abschließend beurteilt. Dies erfolgte Anhand der Strukturmodelle TREK1-E306A 'X-Tail' (PDB-ID: 6cq6), sowie TREK2 'gehoben' (PDB-ID: 4XDJ) und TREK2 'gesenkt' (PDB-ID: 4BW5). Übersichtshalber wurden hier lediglich die Bewertungen für modifizierbare Cystein-Seitenketten dargestellt. Problematisch war hier, dass die Abschirmung durch die Lipidmembran von der Software nicht berücksichtigt wurde, wodurch eine qualitative Bewertung der Ausrichtung zur Beurteilung notwendig war (Abbildung 28 und 29: Ausrichtung). Die Reihenfolge spiegelt hier die vorrangige Orientierung der Seitenkette zu Segmenten (Mxyz), Porehelices (P), dem M2-M3-Übergang (M23Ü), der Fensterierung (F), dem intrazellulären Raum (IC) oder der Lipidmembran (Bilayer, B) wieder. Entsprechend zu hohe Werte der Lipid-orientierten Seitenketten wurden in den Tabellen grau markiert. Das Delta zeigt die Differenz der RASA von gesenkter und X-Tail-Struktur und stellt so die Stärke der Veränderung der Abschirmung dar.

	A <sub>F</sub> I <sub>pH 8</sub>	A <sub>F</sub> I <sub>pH 5</sub>	R <sub>f</sub>	RASA %	Ausrichtung	RASA %	RASA %	Δ	Ausrichtung
	MTSET pH 8	MTSET pH 5		TREK1 X-Tail	gehoben mit Bilayer-Ansicht	gehoben TREK2	gesenkt TREK2	gesenkt X-Tail	gesenkt
WT	1.1	1.7							
<b>M2</b>									
L180C	1.0	1.0							
G181C	1.0	1.4							
I182C	1.1	1.5							
P183C	1.0	1.1							
L184C	1.0	1.2							
F185C	1.0	1.1							
G186C	9.5	50.5	2.0	50	IC		61	43	-7 IC/L304
F187C	8.3	1.1		24	M14/IC		39	48	24 M1/F-(B-IC)
L188C	1.6	2.6	25.6	0	M14P	*	2	1	1 M14P
L189C	0.8	2.2	7.6	19	IC/M4	*	23	19	1 M4/IC
A190C	8.8	7.5	1.3	58	IC		54	42	-16 M41-R312
G191C	1.1	1.6							
V192C	1.1	1.0							
G193C	5.8	4.4	15.6	39	IC/M4	*	41	18	-21 M4/IC
D194C	1.0	1.0							
Q195C	1.0	2.6							
L196C	2.8	1.1		16	M43/B>IC	*	18	16	0 M431/B
G197C	1.2	1.2	8.0	59	IC	*	68	49	-11 M4/IC
T198C	0.5	1.0		31	M1/B-IC		57	57	26 M1/B-IC
I199C	1.0	1.1							
F200C	1.2	1.0		29	M34/B	*	32	6	-23 M34-F229-M306
G201C	10.2	31.1	9.8	59	IC	*	58	63	5 IC
K202C	0.9	3.3							
G203C	1.1	2.3							
I204C	18.9	9.0	3.5	10	M3/B-IC		20	16	6 ERW
A205C	4.1	4.6	5.7	52	IC-B	*	61	62	10 IC-B
K206C	1.0	1.2							
V207C	0.2	1.0		25	M3/B	*	36	41	17 IC-B
E208C	1.4	1.2		31	IC/M3	*	44	55	25 ERW:IC-R222
D209C	1.0	1.0							
T210C	1.1	1.0							
F211C	0.2	1.1		49	B	*	55	65	17 IC-B
I212C	1.0	4.8							
K213C	1.1	2.5							
W214C	1.0	1.0							
N215C	1.0	1.0			M23Ü				
V216C	1.0	1.3			M23Ü				
S217C	1.0	1.0			M23Ü				
Q218C	1.0	1.0			M23Ü				
Mxyz	Abschirmung durch die Segmente			B	Bilayer = Wert zu hoch			IC	IntraCellulär
M23Ü	Übergang von M2 zu M3			F	Fenestrierung			P	Porenhelices

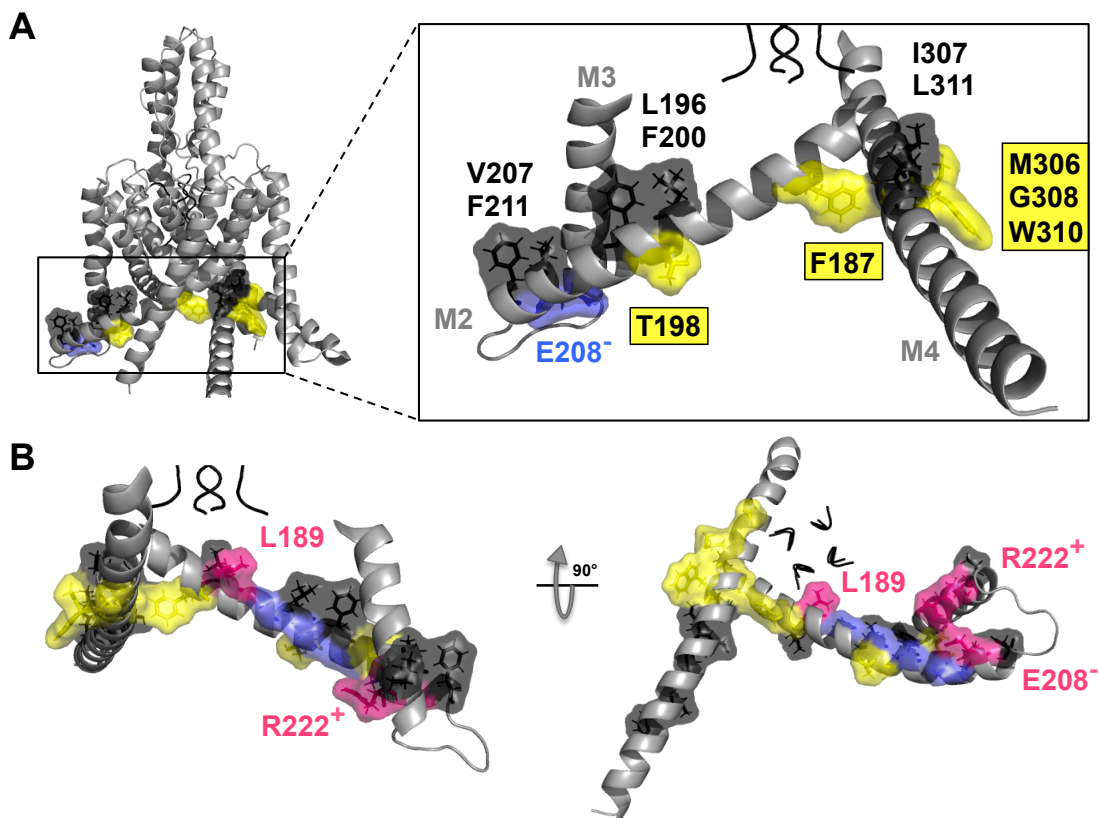
Abbildung 28: Tabelle 2: Auswertung der pH<sub>i</sub>-Zustandsabhängigkeit des M2-Segmentes.



	A <sub>F</sub> I <sub>pH 8</sub>	A <sub>F</sub> I <sub>pH 5</sub>	R <sub>f</sub>	RASA %	Ausrichtung	RASA %	RASA %	Δ	Ausrichtung
	MTSET pH 8	MTSET pH 5		TREK1 X-Tail	gehoben mit Bilayer-Ansicht	gehoben TREK2	gesenkt TREK2	gesenkt-X-Tail	gesenkt
<b>M3</b>									
T219C	0.9	0.9							
K220C	1.1	1.6							
I221C	6.5	12.3	1.0	10	M23Ü(B)	44	17	8	M23Ü
R222C	1.5	1.1	9.9	63	IC-B *	69	25	-39	ERW:-E208-W310
I223C	7.9	4.7	5.5	48	B *	61	52	4	M4/B-IC
I224C	35.8	31.5	2.9	33	B/M2	50	55	22	B/IC
F229C	43.5	46.9	1.8	22	M24-F200-M306	26	14	-8	M24-F200
<b>M4</b>									
W290C	1.0	1.0							
F291C	1.0	1.0							
W292C	1.0	1.0							
I293C	1.0	1.4							
L294C	1.0	1.0							
V295C	1.0	1.0							
G296C									
L297C	1.0	1.1							
A298C	1.0	1.0							
Y299C	1.0	1.3							
F300C	1.0	1.0							
A301C	3.0	3.4	1.4	47	M2/IC	53	37	-11	M2/IC
A302C	1.4	1.5	39.3	40	M23/IC	36	5	-35	M2
V303C	1.0	1.2							
L304C	4.8	4.8	2.0	12	M2P	18	62	51	F-(B-IC)
S305C	4.3	16.7	3.4	57	IC	55	64	7	IC/M3
M306C	1.9	1.1		25	M3-F229/W310/IC	40	21	-4	M32-F229-F200/W310
I307C	2.1	1.0		10	M2/B *	24	31	21	M3/B-IC
G308C	4.4	1.3		21	M2/IC	24	49	28	F-(IC-B)
D309C	0.6	1.0	1.1	47	IC-B	59	58	11	IC-B
W310C	0.3	1.1		46	M3/M306/B>IC	53	31	-15	ERW:-R222
L311C	0.3	1.0		22	M21/B *	31	50	28	IC-B
R312C	1.0	1.0							
V313C	0.3	0.7	1.9	44	IC-B	75	64	21	IC-B
I314C	0.2	0.9	29.1	53	B *	75	74	21	IC-B
S315C	0.1	0.6	99.9	52	B *	79	76	24	IC-B
K316C	1.0	1.0							
K317C	1.0	1.2							
T318C	0.2	2.3	134.1	51	B *				
K319C	1.1	1.2							
E320C	1.0	0.8							
E321C	1.0	1.1							
V322C	0.4	0.6	16.1	50	B *				
G323C	1.0	1.5							
E324C	1.1	1.4							
F325C	0.5	0.8	14.8	61	B *				

Abbildung 29: Tabelle 3: Auswertung der pH<sub>i</sub>-Zustandsabhängigkeit der M3- und M4-Segmente.

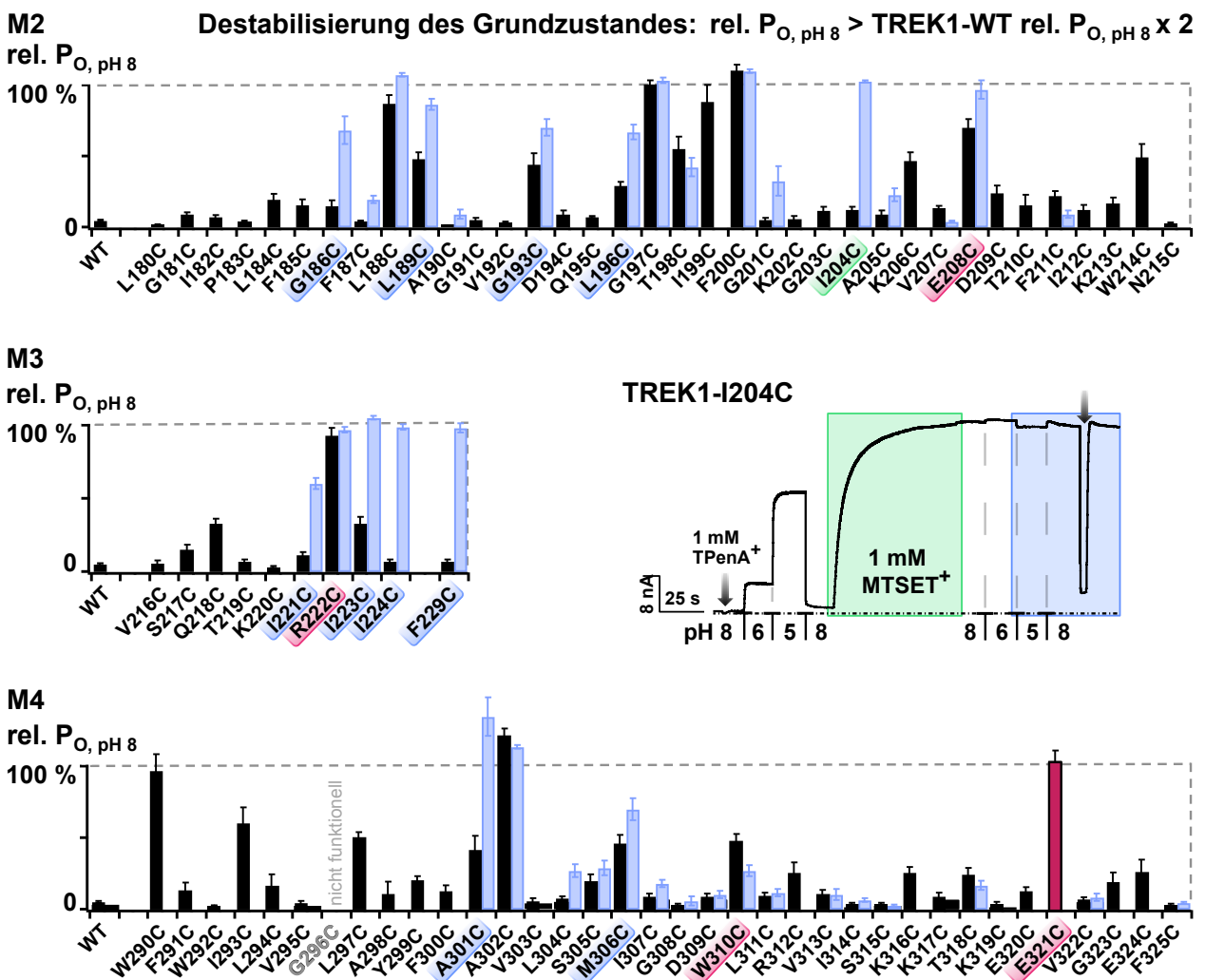
Da kein  $pH_i$ -abhängiger Verlust der  $MTSET^+$ -Modifikation im inaktiven  $pH_i$  8-Zustand beobachtet wurde, kann eine absolute sterische Abschirmung der Cystein-Seitenketten ausschließlich im  $pH_i$ -aktivierten Zustand erfolgt sein, welcher durch die gehobene Helixkonformation repräsentiert wird. Aufgrund der schlechten Auflösung der Seitenketten im Bereich des M2-M3-Überganges der beiden TREK2-Strukturen, beruht die Beurteilung der Abschirmung also primär auf der gehobenen TREK1-E306A-X-Tail-Struktur. Hier lässt sich zudem eine Lipidmembran zu der Proteinstruktur hinzufügen, sodass die Beurteilung der möglichen Abschirmung erleichtert wurde. Zunächst bilden die 12 absolut zustandsabhängigen Cystein-Seitenketten zwei Gruppen innerhalb des Proteins. Zum Einen zeigte sich ein Bündel absolut zustandsabhängiger Seitenketten, bestehend aus den fünf Cystein-Mutationen des M4-Segmentes, sowie dem TREK1-F187C (Abbildung 30A). Die übrigen sind Bestandteil von M2 und zeigen sich in vorwiegend helicaler Anordnung. Schwarz markierte Seitenketten (Abbildung 30A, sowie Abbildung 28 und 29, schwarze Sterne) sind innerhalb dieser Struktur völlig durch die Lipidmembran abgeschirmt, die gelb gefärbten zeigen eine Orientierung entlang der Grenze von Lipidmembran und intrazellulärem Raum. Einzig TREK1-E208C (Abbildung 30A, blau und Abbildung 28 blauer Stern) zeigt eine Ausrichtung in das Poreninnere, sodass eine Abschirmung innerhalb des Proteins oder durch die Membran unwahrscheinlich ist.



**Abbildung 30:** Die  $pH_i$ -zustandsabhängigen Cystein-Seitenketten im Strukturmodell (PDB-ID: 6cq6, [Lolicato et al., 2017]). **A:** 12 absolut zustandsabhängige Seitenketten bilden ein Bündel in der Fenestrierung und eine Gruppe helical angeordneter Seitenketten in M2. TREK1-E208<sup>-</sup> zeigt intrazelluläre Orientierung (blau), die übrigen sind zur Membran (schwarz) oder zur Lipid-Wasser-Grenze (gelb) ausgerichtet. **B:** Alle  $pH_i$ -zustandsabhängigen Seitenketten mit einem  $R_F$  3.5. Markierung analog zu A, mit den intrazellulär orientieren Glycinen in blau und TREK1-L189, -E208<sup>-</sup> und -R222<sup>+</sup> in rot hervorgehoben.

Abbildung 30B zeigt alle Seitenketten, welche mit einem  $R_F$  größer 3.5, als  $pH_i$ -zustandsabhängig eingestuft wurden. Wie TREK1-E208C zeigt eine Reihe von Cystein-mutierten Glycinpositionen eine rein intrazelluläre Orientierung (Abbildung 30B, blau und Abbildung 28, blaue Sterne). Ebenso sind TREK1-L189C und -R222C ins Poreninnere gerichtet (Abbildung 30B, rot und Abbildung 28 und 29, blaue Sterne) und so wirkt auch an diesen Positionen eine Abschirmung unwahrscheinlich. Die übrigen sind analog zu Abbildung 30A markiert und zeigen mindestens eine Ausrichtung zur Wasser-Lipid-Grenze, wenn sie nicht direkt zur Membran orientiert sind.

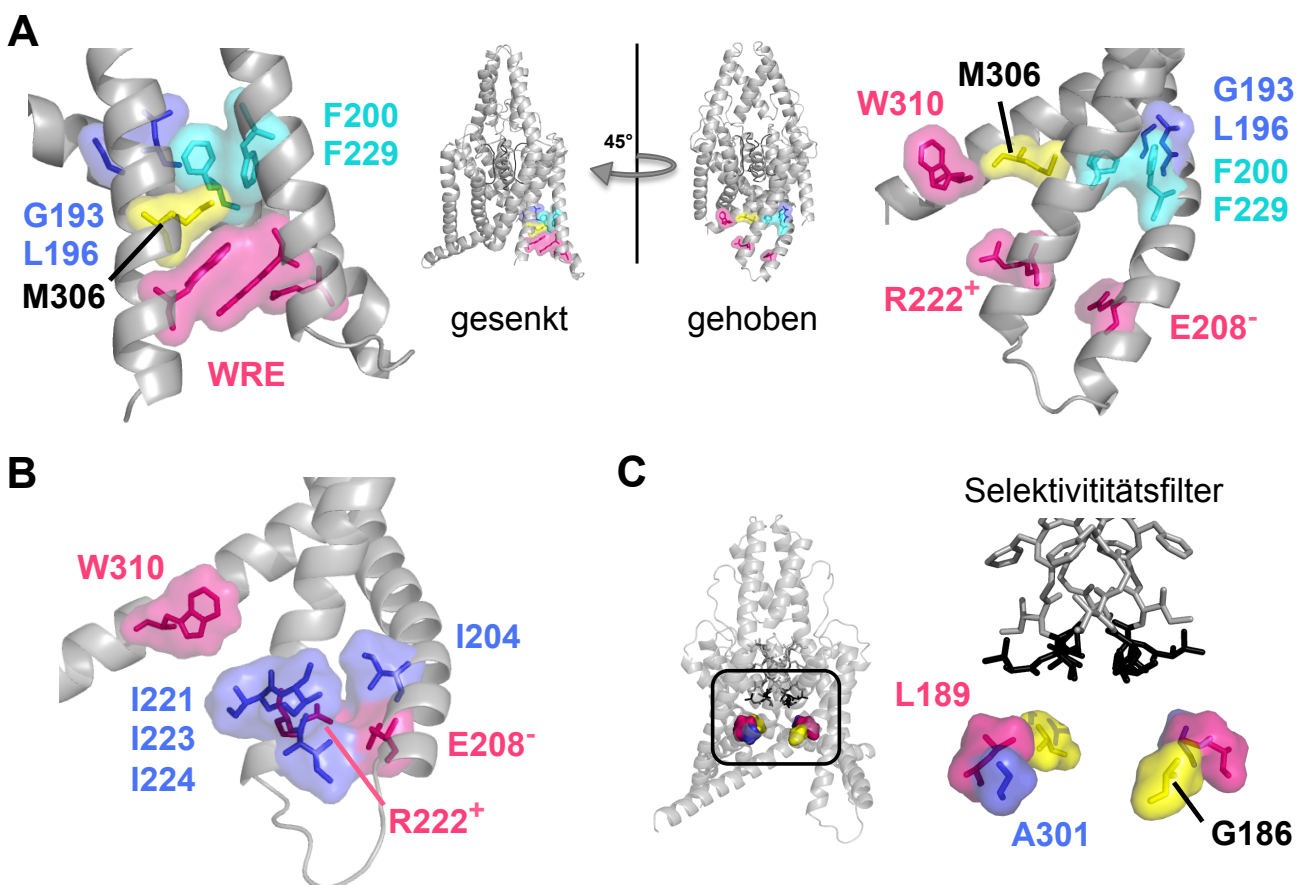
Abschließend sei noch die Auswertung der relativen Offenwahrscheinlichkeiten nach  $MTSET^+$ -Modifikation ( $pH_i$  8) in Abbildung 31 gezeigt. Schwarze Balken repräsentieren die durch Substitution gegen Cystein hervorgerufenen Offenwahrscheinlichkeiten, analog zu Abbildung 14. Blaue Balken zeigen die relative Offenwahrscheinlichkeit nach der Modifikation. Cystein-mutierte Kanäle deren Offenwahrscheinlichkeiten durch die Modifikation auf über 50 % gestiegen sind, wurden blau hinterlegt und die ERW-Interaktionstriade rot hervorgehoben.



**Abbildung 31:** Relative Offenwahrscheinlichkeiten nach  $MTSET^+$ -Modifikation bei  $pH_i$  8. Schwarze Balken: Substitution gegen Cystein (Abbildung 14), blaue Balken: nach  $MTSET^+$ -Modifikation. Mit TREK1-I204C als Beispiel einer konstitutiven Kanalöffnung (blau) nach  $MTSET^+$ -Modifikation (grün).

Eine Betrachtung der nach  $MTSET^+$ -Modifikation destabilisierten Seitenketten, mit einem Anstieg der relativen Offenwahrscheinlichkeit auf über 50 %, erlaubt die Einteilung in vier Gruppen:

1. TREK1-G193 und -L196 liegen in der gehobenen Struktur unmittelbar unterhalb des M4-Segmentes (Abbildung 32A, blau), sodass hier eine Modifikation die gehobene Struktur begünstigen könnte.
2. Zusätzlich zu TREK1-F200C zeigte sich TREK1-F229C nach  $MTSET^+$ -Modifikation destabilisiert. In gesenkter Konformation geben sich diese beiden Phenylalanine in fast paralleler Ausrichtung zu erkennen (Abbildung 32A, cyan). TREK1-M306 (gelb) befindet sich in derselben Konformation zwischen der F200-F229-(FF)-Pi-Bindung und der ERW-Interaktionstriade. Modifikationen an beiden Positionen können also die stabilisierende Interaktion des inaktiven Zustandes erschweren oder verhindern.
3. Im M3-Segment findet sich ein ein destabilisiertes Bündel aus Isoleucinen (Abbildung 31), welches zusammen mit TREK1-I204C, die ERW-Interaktionstriade umringt (Abbildung 32B).
4. Abbildung 32C zeigt TREK1-G186 (gelb) und -A301 (blau), sowie das bereits zuvor erwähnte TREK1-L189 (rot). Diese drei sind alle zum Poreninneren orientiert und liegen innerhalb einer Ebene, direkt unterhalb des Selektivitätsfilters.



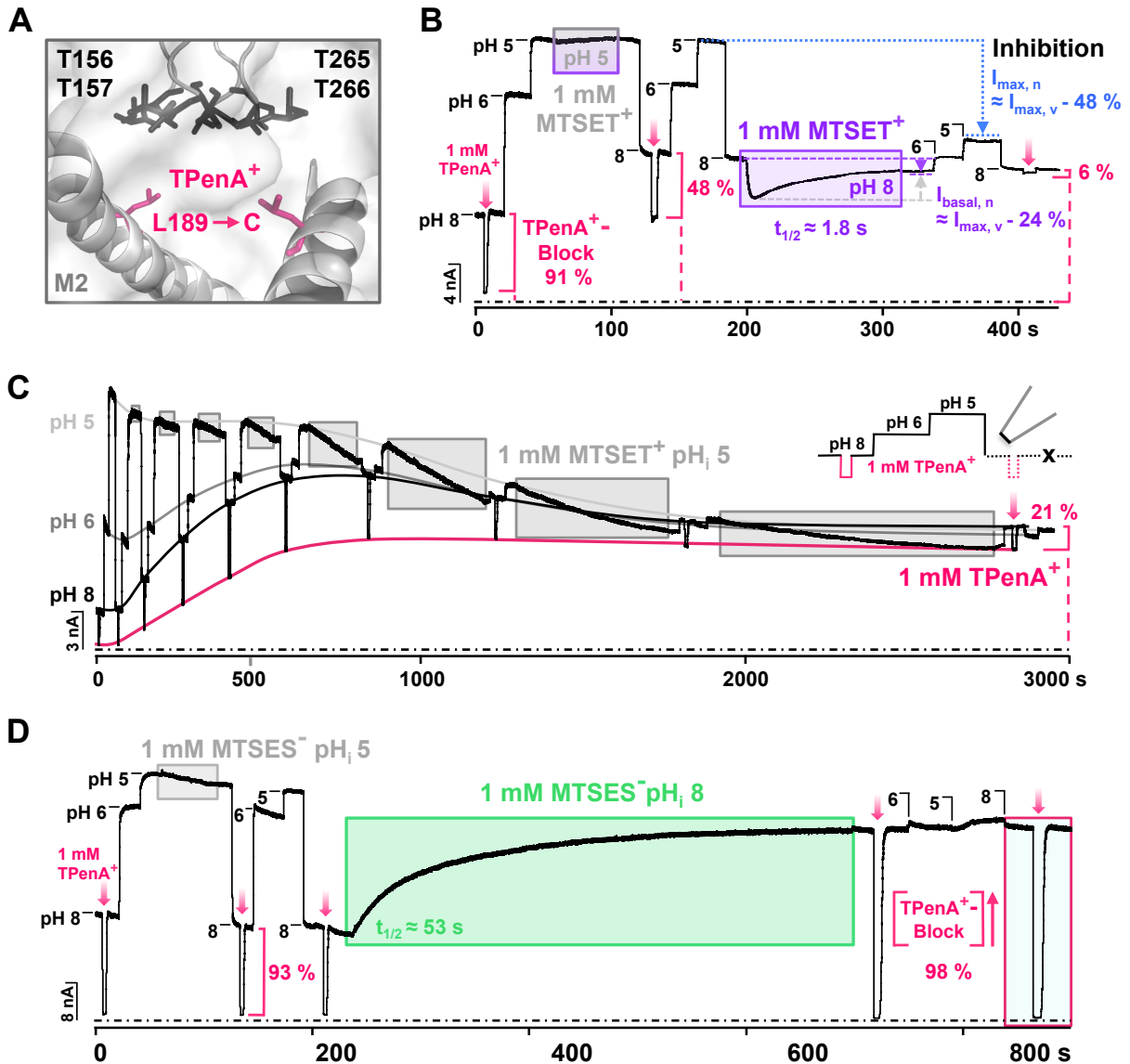
**Abbildung 32:** Nach  $MTSET^+$ -Modifikation destabilisierte Cystein-Mutationen im Strukturmodell. **A:** TREK1-G193 und -L196 (blau) unterhalb des M4-Segmentes, sowie -F229 in nahezu paralleler Orientierung zu -F200 (cyan). TREK1-M306 (gelb) im Zentrum von FF-(cyan) und ERW-Interaktion (rot). **B:** Isoleucinbündel (blau) im Bereich der ERW-Interaktionstriade (rot) im gehobenen Strukturmodell (PDB-ID: 6cq6, [Lolicato et al.,2017]). **C:** Die Ebene unterhalb des Selektivitätsfilters: A301 (blau), G186 (gelb) und L189 (rot).

Für TREK1-L189C (Abbildung 32D, rot), mit zunächst relativ normalem  $pH_i$ -Verhalten stark erhöhter Offenwahrscheinlichkeit (rel.  $P_{O, pH_i 8} = 48 \% \pm 4.5$ ,  $n = 20$ ), lag die relative Offenwahrscheinlichkeit nach einer Modifikation des  $pH_i$  5-Zustandes mit  $59 \% (\pm 3.9, n = 10)$  deutlich unter dem Wert der  $pH_i$  8-Modifikation (rel.  $P_O = 89 \% \pm 5.1$ ,  $n = 10$ ). Wie im Falle von TREK1-I204C (Abbildung 27) lag dies an einer  $pH_i$ -abhängigen Verlangsamung des doppelt exponentiellen Modifikationsverlaufs aus  $pH_i$  8 zu linearer Stromentwicklung aus  $pH_i$  5.

Diese Kanal-Mutation wies durch MTSET<sup>+</sup> eine Inhibition des initial  $pH_i$  5-aktivierbaren Maximalstromes um  $47 \% (\pm 2.4, n = 10, \text{Abbildung } 33B, \text{blau})$  auf. Die deutlich geringere Inhibition des Basalstromes bei  $pH_i$  8, um lediglich  $24 \% (\text{Abbildung } 33B, \text{biolett})$ , näherte die beiden  $pH_i$ -Zustände einander an und reduzierte so den  $pH_i$ -regulierbaren Bereich des TREK1-L189C. Die relative Offenwahrscheinlichkeit des modifizierten Kanals lag nun bei  $89 \% (\pm 5.1, n = 10)$  im Vergleich zu  $48 \%$  vor der Modifikation. Der nahezu gänzliche Verlust des TPenA<sup>+</sup>-Blocks nach der Applikation des positiv geladenen Methanthiosulfonates war einzigartig im analysierten Bereich der Segmente M2, M3 und M4. Substitution von TREK1-L189 nach Cystein schwächte den QAA<sup>+</sup>-Block zunächst leicht auf  $91 \% (\pm 2.2, n = 10, \text{Abbildung } 33B, \text{rot, links})$  ab, welcher dann, durch Modifikation mittels MTSET<sup>+</sup>, auf lediglich  $6 \% (\pm 1.5, n = 5, \text{Abbildung } 33B, \text{rot, rechts})$  drastisch reduziert wurde. Da TREK1-L189C unmittelbar unterhalb des Selektivitätsfilters lokalisiert und Teil der TPenA<sup>+</sup>-Bindungsstelle ist [Piechotta et al., 2011], war der Verlust des TPenA<sup>+</sup>-Blocks nach der Modifikation nicht überraschend.

MTSET<sup>+</sup> appliziert auf den aktiven Zustand des TREK1-L189C ( $pH_i$  5, 40 s), zeigte zunächst keine Veränderung des Maximalstromes, wohingegen der Basalstrom um den Faktor  $2.2 (\pm 0.4, n = 10)$  zunahm. Dies, zusätzlich zu der verminderten Blockierung des Kanals durch  $1 \text{ mM TPenA}^+$  auf lediglich  $48 \% (\pm 6.12, n = 3, \text{Abbildung } 33B, \text{rot, Mitte})$ , bewies eine Modifikation der TREK1-L189C-Kanäle, welche nach 40 s Applikation bei  $pH_i$  5 allerdings unvollständig war (Abbildung 33B, Kontroll-Modifikation mittels  $1 \text{ mM MTSET}^+_{pH_i 8}$ ). Die Stromantwort in Abbildung 33C zeigt ein Langzeitexperiment der  $pH_i$  5-Modifikation. Die repetitive Verwendung des  $pH_i$ -Protokolls während der Applikation über 3000 s offenbarte den Verlauf der Modifikation, sowie des TPenA<sup>+</sup>-Blocks (rot). Der Maximalstrom (Abbildung 33C,  $pH$  5, hellgrau) des TREK1-L189C-Kanals blieb zunächst näherungsweise konstant und zeigte erst nach etwa 600 bis 800 s eine irreversible Abnahme der Stromgröße bis auf  $45 \%$  (nach Abschluss dieses Einzelerperimentes). Die Entwicklung der durch niedrigere Protonenkonzentrationen induzierten Ströme ( $I_{pH_i 6}$  und  $I_{pH_i 8}$ ), nahm dagegen einen vollkommen anderen Verlauf. Der zügige Anstieg der Stromgrößen innerhalb der ersten 600 bis 800 s, ging in einen flachen, inhibitorischen Verlauf der Modifikation über, bis schließlich eine relative Offenwahrscheinlichkeit von  $104 \%$  erreicht wurde. Der Verlust des TPenA<sup>+</sup>-Blocks wurde hier ebenfalls zeitlich aufgelöst (Abbildung 33C, rot). Der Anteil des blockierbaren Stromes sank mit fortschreitender Modifikation von hier initial  $99$  auf nur noch  $21 \%$ .

Ob, durch die TREK1-L189C-Modifikation, lediglich eine sterische Hinderung des TPenA<sup>+</sup>-Blocks oder eine Filterinteraktion des modifizierten TREK1-L189C vorlag, konnte an dieser Stelle durch die Verwendung eines anderen Reagenzes vergleichbarer Größe untersucht werden. Hierzu wurde der Effekt auf den TPenA<sup>+</sup>-Block, sowie die  $pH_i$ -Abhängigkeit der MTS-Modifikation an TREK1-L189C durch Applikation des negativ geladenen MTSES<sup>-</sup> analysiert und die Ergebnisse in Abbildung 33D dargestellt.



**Abbildung 33:** MTS-Modifikation von TREK1-L189C zeigt Einfluss auf den Selektivitätsfilter. **A:** Lokalisation des Selektivitätsfilter-orientierten TREK1-L189C (PDB-ID: 4XDJ [Dong et al., 2015]). **B:** Dauerhafte Öffnung des TREK1-L189C-Kanals, bei gleichzeitiger Halbierung des Maximalstromes ( $I_{max}$ , blau) und Verlust des TPenA<sup>+</sup>-Blocks (rot) mit fortschreitender Modifikation auf durchschnittlich 6 von initial 91 %. **C:** Verlangsamung der Modifikationsgeschwindigkeit durch MTSET<sup>+</sup><sub>pH<sub>i</sub> 5</sub> im repetitiven Protokoll über 3000 s. **D:** Konstitutiv geöffneten TREK1-L189C-Kanal nach Basalstromsteigerung durch MTSES<sup>-</sup>-Modifikation und Verbesserung des TPenA<sup>+</sup>-Blocks von 93 auf 98 %.

Eine Applikation von 1 mM MTSES<sup>-</sup> auf den aktiven Kanalzustand zeigte ebenso wenig Wirkung auf die  $pH_i$ -Eigenschaften des TREK1-L189C-Kanals, wie auf den TPenA<sup>+</sup>-Block (Abbildung 33D, grau). Die Modifikation aus dem Zustand geringer Protonenkonzentration bei  $pH_i$  8 war jedoch eindeutig und führte zu einem vollkommenen Verlust der  $pH_i$ -Regulierbarkeit (grün). Besonders auffällig war dabei die Verbesserung des durch 1 mM TPenA<sup>+</sup> hervorgerufenen Porenblocks auf WT-analoges Niveau, von initial 93 % ( $\pm 0.6$ ,  $n = 8$ ) auf 98 % ( $\pm 0.95$ ,  $n = 8$ , Abbildung 33D, rot) nach MTSES<sup>-</sup>-Modifikation. Eine rein sterische Hinderung durch die gebundenen MTS-Reagenzien konnte somit ausgeschlossen und ein möglicher Einfluss des modifizierten TREK1-L189C auf den Selektivitätsfilter des TREK1-Kanals offenbart werden.

## 4 Diskussion

Aktivierungen über mechanischen Stress ( $\Delta p$  oder Phospholipide, wie  $\text{PIP}_2$ ), mehrfach-ungesättigte Fettsäuren, wie Arachidonsäure und intrazelluläre Azidose sind alle mit dem C-Terminus assoziiert und zeigen am TREK1-Kanal Aktivierungen vergleichbarer Stärke und einen Verlust der Aktivierbarkeit nach Alanin-Substitution des  $\text{pH}_i$ -sensorischen TREK1-E321<sup>-</sup> [Honoré et al., 2002]. Nach hinreichend großer Aktivierung mittels dieser Stimuli, geht der spannungsabhängig auswärtsrektifizierende Kanal in einen offenen Hintergrundkanal linearen Strom-Spannungsverlaufes über, dessen Verhalten anhand der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung beschrieben werden kann [Honoré et al., 2002; Chemin et al., 2005a]. Auch C-terminale Dephosphorylierung überführt den TREK1-Kanal reversibel in einen aktiven Hintergrund- oder 'Leck'-Kanal [Bockenbauer et al., 2001].

Eine Aufhebung der Spannungsregulierung durch Mutation der  $\text{K}^+$ -koordinierenden Threonine des konservierten Selektivitätsfiltermotivs, resultierten in einer Insensitivität gegenüber den genannten Stimuli und weisen so auf den weitgehend konservierten Selektivitätsfilter, als gemeinsame und primär regulierende Einheit der  $\text{K}_{2P}$ -Kanäle [Schewe et al., 2016]. Der Übertragungsweg der C-terminalen Signale auf den Selektivitätsfilter wurde bisher nicht aufgeklärt und diese Fragestellung konnte auch an dieser Stelle nicht abschließend beantwortet werden. Diese Art der Kanalaktivierung, bezeichnet als 'C-Type Gating' wurde aber bereits vor vielen Jahren in Bezug auf TREK-Kanäle postuliert ([Cohen et al., 2008; Bagriantsev et al., 2011/2012; Piechotta et al., 2011]). Im Rahmen dieser Arbeit bestätigte die Analyse der intrazellulären Porensegmente die angenommene allosterische Veränderung der Proteinstruktur, vom C-Terminus bis hinauf zur  $\text{K}^+$ -durchlässigen Filterregion des TREK1-Kanals. Die erhaltenen Daten offenbarten diverse Seitenketten der Kanalpore, deren Interaktionen den inaktiven Grundzustand des TREK1-Kanals stabilisieren.

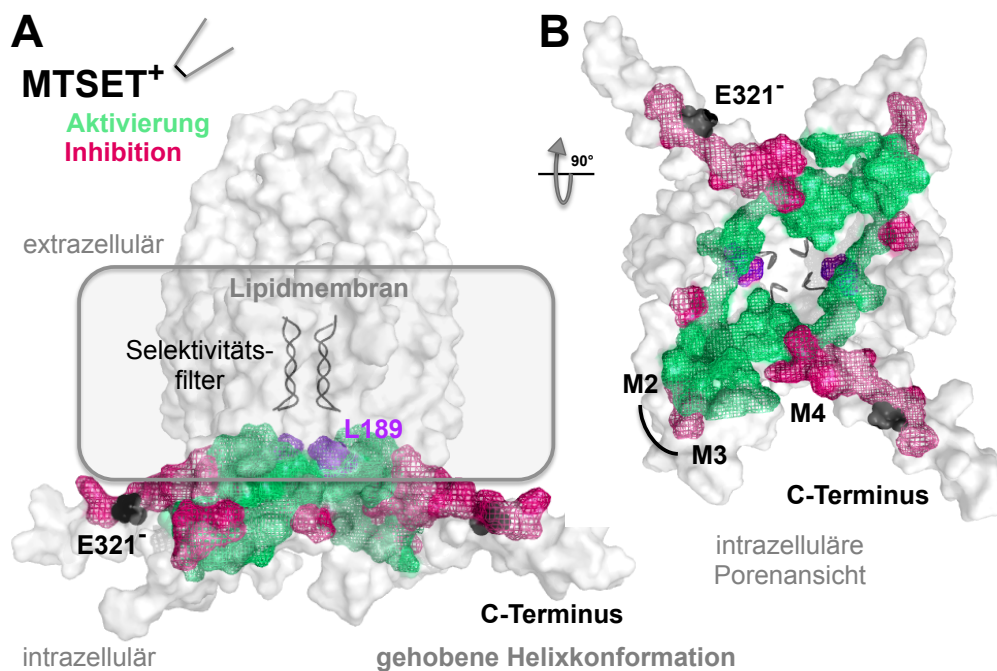
Zur mechanistischen Aufklärung der  $\text{pH}_i$ -Regulation wurde zunächst der Einfluss von Einzelmutationen auf die Funktionalität der intrazellulären Porensegmente des TREK1-Kanals untersucht. Die basale Offenwahrscheinlichkeit galt dabei als Maß für die Destabilisierung durch systematische Cystein-Substitution einzelner Aminosäuren der porenbildenden Segmente M4 (W290-I314) und M2 (L180-W214), sowie des porenformenden M3-Aufgangs (N215-I224) und des proximalen C-Terminus (S315-R326). Waren die Interaktionen des strukturellen Grundzustandes des Proteins nach Mutation einzelner Aminosäuren gestört, so wurde der gesenkte inaktive Zustand des Kanals destabilisiert und eine dauerhafte Öffnung der TREK1-Kanäle war die Folge. Die Höhe der basalen Offenwahrscheinlichkeit wurde dann zur Beurteilung der Stärke der Destabilisierung des Grundzustandes herangezogen, wobei für eine Wahrscheinlichkeit von 100 % die Öffnung aller vorhandenen Kanäle angenommen wurde.

Zusätzlich wurden die  $\text{pH}_i$ -induzierten Segmentbewegungen der TREK1-Kanäle durch eine Überprüfung der Zugänglichkeit aller 82 intrazellulären Mutationen via MTS-Modifikation der Cystein-Seitenketten, in inaktivem ( $\text{pH}_i$  8) und aktiviertem Zustand ( $\text{pH}_i$  5) der Kanäle geprüft und anhand der Modifikationsgeschwindigkeiten beider  $\text{pH}_i$ -Zustände verglichen (SCAM, siehe Abschnitt 2.2). Abschließend wurde die Destabilisierung des Grundzustandes nach erfolgreicher MTS-Modifikation betrachtet und so weitere gating-relevante Seitenketten der TREK1-Kanalpore identifiziert.

### 4.1 Die protoneninduzierte Bewegung der Poresegmente des TREK1-Kanals

Die irreversible Bindung des positiv geladenen Methanthiosulfonates  $\text{MTSET}^+$  an Schwefelatome freiliegender Cystein-Seitenketten, führt nach einer intrazellulären Applikation auf die Cystein-freie Pore des TREK1-WT-Kanals zu keiner Veränderung der Stromantwort. Die Bindung des  $\text{MTSET}^+$  an systematisch eingeführte Cysteine ist somit klar vom nativen Verhalten abzugrenzen und zeigt die Zugänglichkeit der einzelnen Cystein-substituierten Seitenketten für das positiv geladene Methanthiosulfonat.

Abbildung 34 zeigt die qualitativen Ergebnisse der  $\text{MTSET}^+$ -Modifikation aller drei Poresegmente im Strukturmodell des TREK1-Kanals (PDB-ID: 6cq6, [Lolicato et al., 2017]). Durch  $\text{MTSET}^+$  aktivierbare Cystein-Mutationen sind dabei grün dargestellt und alle im Inneren der Kanalpore lokalisiert. Inhibitorisch modifizierte Mutationen (rot) sind dagegen an den Grenzflächen, vorwiegend zu der Membran, oder auch der cytosolischen Wasserphase orientiert. Ausnahme ist hier nur TREK1-L189C (Abbildung 34A+B, violett).



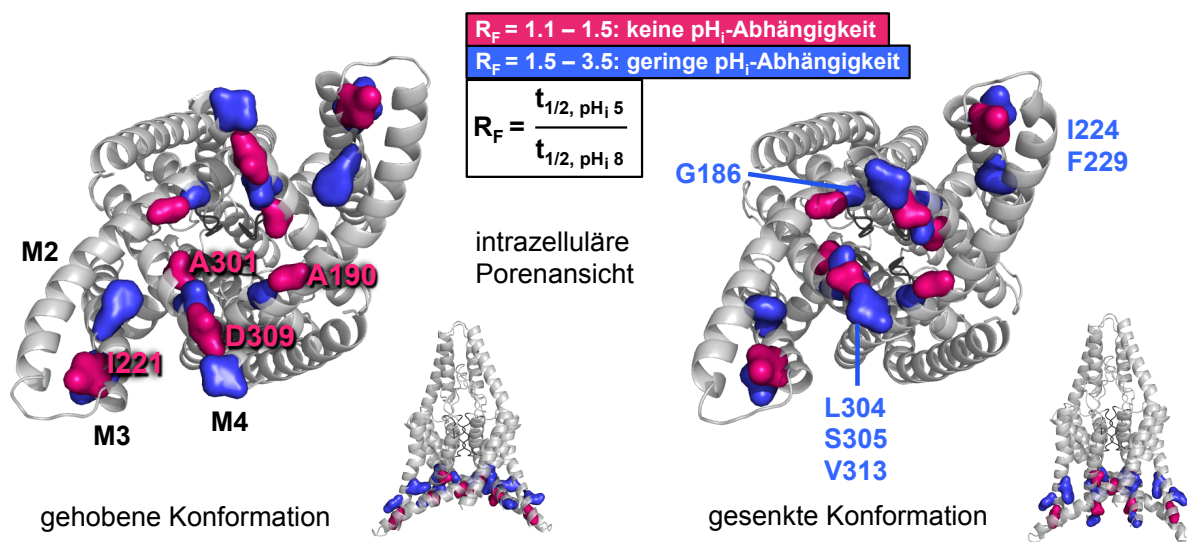
**Abbildung 34:** Lokalisation und MTS-Effekte der modifizierten Cystein-Seitenketten im Strukturmodell (PDB-ID: 6cq6, [Lolicato et al., 2017]).  $\text{MTSET}^+$ -Aktivierung (grün) an Mutationen innerhalb der Pore des TREK-Kanals und Inhibition (rot) von vorwiegend an der Lipidmembran lokalisierten Seitenketten, mit dem Protonensensor  $\text{E321}^-$  (schwarz), sowie dem inhibitorisch-modifizierten und Selektivitätsfilter-orientierten L189C (violett), in Seitenansicht (A) und mit Blick durch Pore von intrazellulär (B).

Aktivierung des Stromes bei Modifikation der Seitenketten innerhalb der Kanalpore deutet auf eine Begünstigung der gehobenen Kanalstruktur durch Wechselwirkung des  $\text{MTSET}^+$  mit den Poresegmenten, oder der gebundenen Moleküle untereinander. Die inaktive, gesenkte Konformation könnte entsprechend durch Interaktion der modifizierten Seitenketten mit der Membran bevorzugt werden und so die Inhibition der Ströme erklären.



Das Selektivitätsfilter-orientierte und inhibitorisch modifizierbare TREK1-L189C zeigte eine klare Abhängigkeit vom intrazellulären pH-Wert (Abbildung 33) und die erhaltenen Daten lassen einen Einfluss des modifizierten Kanals auf den Selektivitätsfilter vermuten. Als ebenfalls stark  $\text{pH}_i$ -abhängig zeigten sich die modifizierbaren Seitenketten des C-Terminus (TREK1-S315, -T318C, -V322C und -F325C), wobei TREK1-S315C und -T318C mit  $R_F \geq 100$  (Abbildung 29) sogar die stärkste Abhängigkeit aufwiesen. Diese vier helical angeordneten Seitenketten liegen alle membran-orientiert, waren aber in den beiden  $\text{pH}_i$ -Zuständen des Kanals modifizierbar, also nie gänzlich durch die Membran abgeschirmt. Eine Applikation aus  $\text{pH}_i$  5 verlangsamte hier lediglich die Geschwindigkeit ihrer MTSET<sup>+</sup>-Modifikationen, wie bei nahezu allen untersuchten Cystein-Mutationen ( $\text{pH}_i$ -abhängige Bindung, 66 Mutationen) bis zur absoluten Abschirmung einiger Seitenketten ('absolute'  $\text{pH}_i$ -Abhängigkeit, 12 Mutationen).

Lediglich 4 mutierte TREK1-Kanäle wiesen in beiden Zuständen nahezu gleiche Modifikationsraten auf ( $R_F < 1.5$ , rot) und 6 Kanal-Mutationen zeigten nur eine geringe Abhängigkeit vom  $\text{pH}_i$ -Wert ( $R_F$  1.5 - 3.5, blau). Abbildung 35 zeigt diese Seitenketten in gehobener (PDB-ID: 4XDJ [Dong et al.,2015], links) und gesenkter Konformation (PDB-ID: 4BW5 [Dong et al.,2015], rechts).

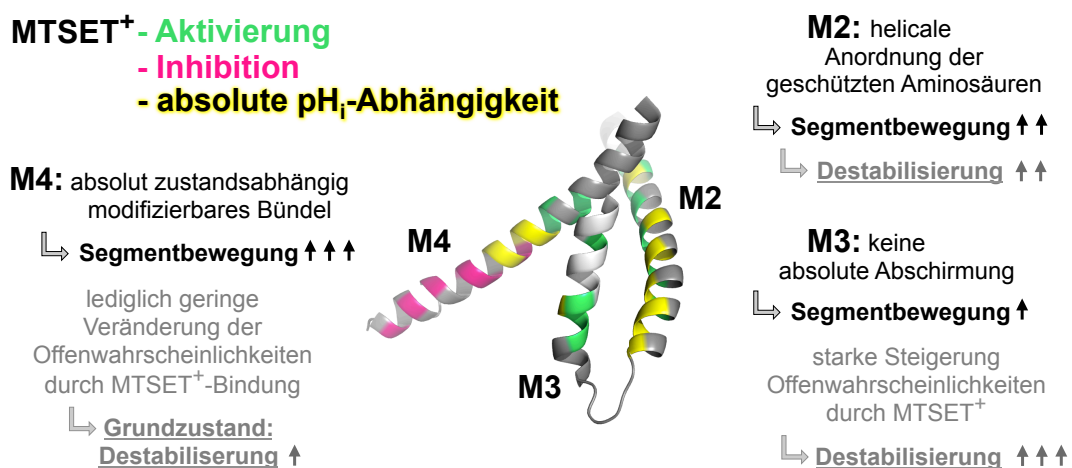


**Abbildung 35:** Gering und nicht  $\text{pH}_i$ -abhängige Seitenketten der Poresegmente M2, M3 und M4. Markierung der gering (blau) und nicht  $\text{pH}_i$ -abhängige Seitenketten (rot) in intrazellulärer Porensicht des TREK2-Strukturmodells in gehobener (PDB-ID: 4BW5 [Dong et al.,2015], links) und gesenkter Helixanordnung (PDB-ID: 4XDJ [Dong et al.,2015], rechts). Berechnung der Ratenfaktoren ( $R_F$ ) durch Quotientenbildung der Zeiten nach halbmaximaler Modifikation ( $t_{1/2}$ ), sowie die Farbcodierung anhand eigens festgelegter  $R_F$ -Grenzwerte zur  $\text{pH}_i$ -Abhängigkeit (rot, blau).

Ausschließlich die offen zugänglichen Cystein-Seitenketten des TREK1-I221 und -D309 zeigten keine Veränderung der Rate ( $R_F \approx 1$ ). Die geringe Steigerung im Falle von TREK1-A190C und -A301C ( $R_F \approx 1.4$ , Abbildung 28 und 29) lässt sich ebenfalls anhand ihrer freien Lage im Protein erklären (Abbildung 35, rot). Der Großteil dieser 10 Seitenketten, säumt in der gesenkten Helixkonformation den wässrig gefüllten Innenraum der TREK-Pore (Abbildung 35, rechts) und zeigt sich auch in gehobener Konformation der Segmente vorwiegend cytoplasmatisch orientiert (Abbildung 35, links). TREK1-I221, sowie I224 und F229 liegen nicht an der Porenwand, zeigen aber primär cytoplasmatische Ausrichtung und sind so ebenfalls in beiden Zuständen offen zugänglich.

Die aussagekräftigsten Resultate ergaben sich aus der Enthüllung der abhängig vom  $\text{pH}_i$ -Zustand, absolut unzugänglichen Cystein-Mutationen (Abbildung 36, gelb). Applikation bei einem  $\text{pH}_i$ -Wert von acht, resultierte in einer Modifikation, wohingegen das  $\text{MTSET}^+$  an den aktivierten Kanalzustand aus  $\text{pH}_i$  5 nicht gebunden wurde. Die Seitenketten TREK1-M306C, -I307C, -G308C, -W310C, -L311C und -F187C zeigten diese absolute Abhängigkeit von der Protonenkonzentration und bilden ein Aminosäurebündel im Übergang des M4-Segmentes in den C-Terminus. Die völlige sterische Abschirmung eines solchen Bündels aus fünf Seitenketten wies auf eine starke strukturelle Verschiebung dieser Region innerhalb der Proteinstruktur (Abbildung 36, schwarz). Die absolut  $\text{pH}_i$ -zustandsabhängigen M2-Mutationen TREK1-L196C, -T198C, -F200C, -V207C, -E208C und -F211C sind dagegen helical lokalisiert und erstrecken sich, zusammen mit TREK1-F187C, über 24 Aminosäuren des M2-Segmentes. Hier war lediglich von einer M2-Rotation und weniger einer weitreichenden Bewegung auszugehen. Die Analyse des M3-Segmentes ergab keine  $\text{pH}_i$ -abhängigen Unzugänglichkeiten für  $\text{MTSET}^+$  (Abbildung 36, M3) und identifizierte diesen Bereich somit als weitestgehend starre Proteinregion.

Um die Vorgänge innerhalb des Kanales nachzuvollziehen, wurde zusätzlich zur Untersuchung der Bewegungen der Porensegmente (Zugänglichkeit für  $\text{MTSET}^+$ ), auch die Destabilisierung des Grundzustandes durch Cystein-Mutation oder -Modifikation (relative Offenwahrscheinlichkeiten), zur Analyse herangezogen und die Ergebnisse in Abbildung 36 zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 36:** Schema der  $\text{MTSET}^+$ -Effekte auf die Porenhelices einer TREK1-Untereinheit. Stromaktivierung der Cystein-Mutationen durch  $\text{MTSET}^+$  (grün), -Inhibition (rot) und in  $\text{pH}_i$  5 abgeschirmte Cystein-Seitenketten (gelb) in gehobener Helixkonformation (PDB-ID: 4BW5 [Dong et al., 2015]). Bewertung der Stärke der Segmentbewegung (schwarz) und Destabilisierung des Grundzustandes (grau) in M2, M3 und M4: stark (↑↑↑), mittelstark (↑↑) und schwach (↑).

Als Maß für die  $\text{MTSET}^+$ -Destabilisierung des Grundzustandes (Abbildung 36, unterstrichen) diene die Steigerung der relativen Offenwahrscheinlichkeit durch Modifikation der Cystein-Mutationen.  $\text{MTSET}^+$  appliziert auf Cystein-Seitenketten des M3-Segmentes steigerte vorwiegend die Basalströme der TREK1-Kanäle bis zu ihrer konstitutiven Öffnung und sorgte somit für eine starke Destabilisierung des Grundzustandes. Diverse Cystein-Mutationen innerhalb des M2-Segmentes wiesen nach  $\text{MTSET}^+$ -Bindung ebenfalls nahezu keine  $\text{pH}_i$ -Regulierbarkeit mehr auf. Das Ausmaß der Basalstromsteigerung war hier jedoch geringer als innerhalb des M3-Segmentes. Die destabilisierenden  $\text{MTSET}^+$ -Effekte auf das Kanalprotein durch M2-Modifikationen waren also weniger stark ausgeprägt.

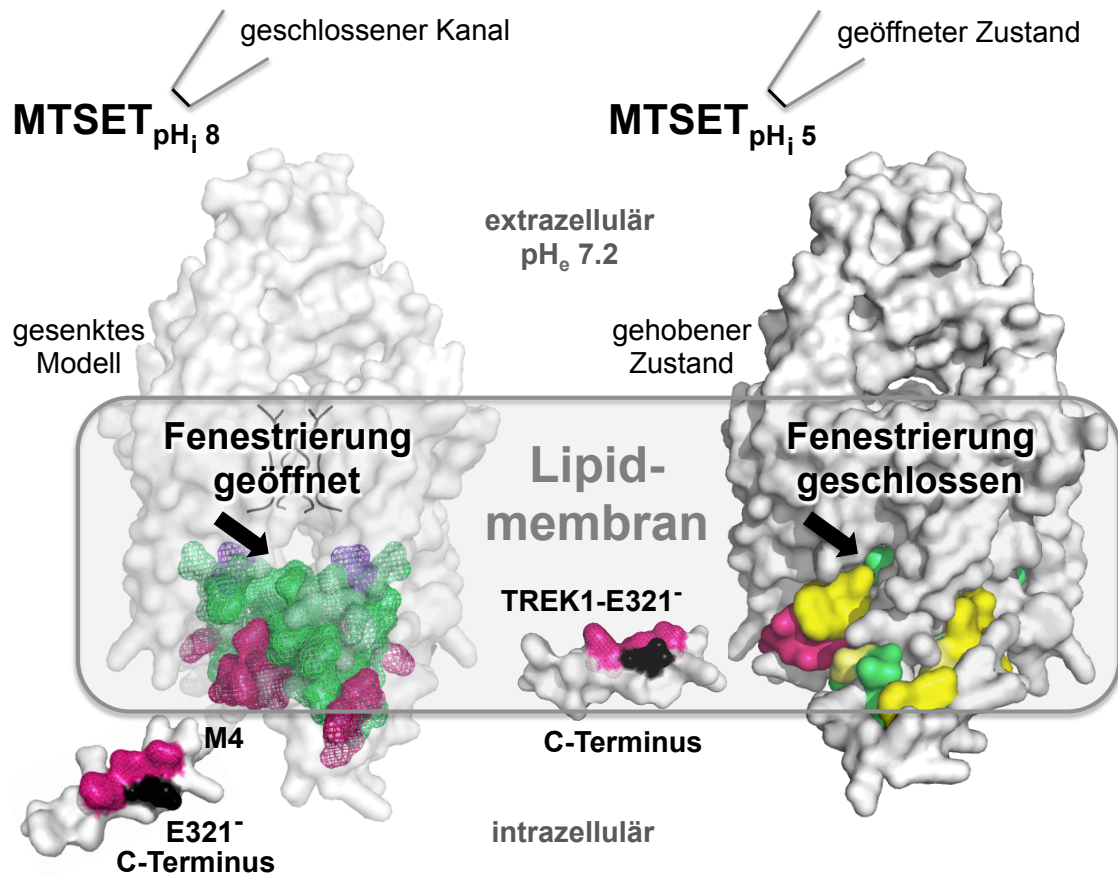
Die Basalstromzunahme innerhalb des M4-Segmentes war deutlich geringer und unterschied sich nur wenig von der Potenz der Maximalstromaktivierung, welche von M4 über M2 und schließlich zu M3 leicht sank (nicht gezeigt, Daten siehe Anhang 5.2). Die vergleichbaren Größenordnungen von Basal- und Maximalstromänderungen sorgten für eine weitgehend intakte  $\text{pH}_i$ -Regulierbarkeit nach  $\text{MTSET}^+$ -Bindung an M4-Seitenketten, wohingegen Modifikationen an der M2- und im besonderen der M3-Helix, zu einem Verlust der Kanalfunktion führten. In anderen Worten, die Bewegungen des M3-Segmentes sind besonders im Vergleich zur M4-, aber auch zur M2-Helix, eher gering, die Destabilisierung des Grundzustandes, war aber hier am stärksten. Für das M4-Segment zeigten die Ergebnisse das Gegenteil.

Abbildung 37 zeigt die qualitativen Ergebnisse der  $\text{MTSET}^+$ -Modifikationen der TREK1-Pore aus den Abbildungen 28 und 29 in gesenkter und gehobener Anordnung der Porensegmente (PDB-ID: 4XDJ/4BW5 [Dong et al.,2015]) in Frontalansicht. Aktivierungen durch  $\text{MTSET}^+$  sind dabei erneut grün, Inhibitionen rot und durch  $\text{pH}_i$  5 bedingten Modifikationsverlust, absolut zustandsabhängige Cystein-Seitenketten gelb dargestellt.

Die absolut  $\text{pH}_i$ -zustandsabhängigen Cystein-Mutationen zeigen sich in der gesenkten Helixkonformation des Strukturmodelles des TREK2-Kanals cytoplasmatisch zugänglich (Abbildung 37, links) und weitestgehend abgeschirmt in der gehobenen Anordnung (Abbildung 37, gelb, rechts). Dies assoziiert den Modifikationsverlust im aktivierten Zustand bei  $\text{pH}_i$  5 direkt mit dem gehobenen Strukturmodell des TREK-Kanals. Die gesenkte Konformation der Helices scheint demnach dem Grundzustand zu entsprechen.

Der zur Aufklärung der Proteinstrukturen (PDB-ID: 4XDJ/4BW5 [Dong et al.,2015]) trunke C-Terminus, mit dem sensorischen TREK1-E321<sup>-</sup> (Abbildung 37, schwarz), wurde eigens nachmodelliert und für die Frontaldarstellungen angefügt. Die  $\text{pH}_i$ -induzierten Auf- und Abwärtsbewegungen, vorwiegend des M4-Segmentes, gehen mit einer helicalen M4-Rotation um etwa 45° einher (PDB-ID: 4XDJ/4BW5 [Dong et al.,2015]), welche die proteininternen Wechselwirkungen (wie ERW-Dömeninteraktion) aufhebt. Die Porensegmente werden angehoben ( $\text{M4} > \text{M2} > \text{M3}$ ) und die seitliche Membran-Fenestrierung schließt beim Übergang in den aktiven Kanalzustand (Abbildung 37, PDB-ID: 4XDJ/4BW5 [Dong et al.,2015]).

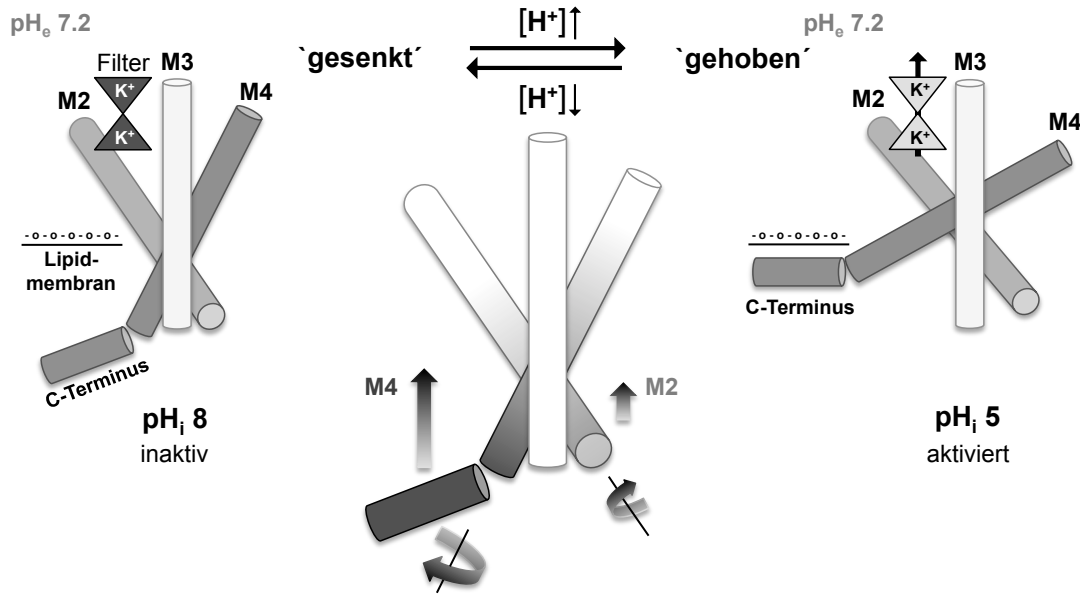
$\text{MTSET}^+$ -Modifikationen an Cystein-Seitenketten im Inneren der Pore des Kanalproteins steigerten die TREK1-Ströme und zeigten damit die Anhebung der Porenhelices durch Methanthiosulfonatbindung (grün). Modifikationen an Grenzflächen reduzierten den  $\text{pH}_i$ -aktivierbaren Strom und wiesen hingegen auf eine Begünstigung der gesenkten Konformation des Kanals durch  $\text{MTSET}^+$ -Bindung an diesen Seitenketten (rot). Der Inhibition des Sonderfalles des TREK1-L189C lag offenbar einer Selektivitätsfilter-Interaktion zugrunde und war nicht konformationsbedingt. Der Verlust des TPenA<sup>+</sup>-Blocks durch Bindung des positiv geladenen Methanthiosulfonates, zusammen mit der Verbesserung eben dieses Blocks durch Bindung des negativ geladenen und vergleichbar großen  $\text{MTSES}^-$ , bestätigte diese Annahme (Abbildung 33). Die stichprobenartige  $\text{MTSES}^-$ -Modifikation einiger Mutanten zeigte sonst keine auffälligen Unterschiede gegenüber der Verwendung des positiv geladenen Methanthiosulfonates und schloss so eine allgemeine Abhängigkeit des modifizierenden Effektes von der Ladung des Methanthiosulfonates aus.



**Abbildung 37:** Darstellung der  $\text{MTSET}^+$ -Effekte in den Strukturmodellen des TREK2-Kanals. Aktivierung (grün), Inhibition (rot) und Abschirmung der absolut  $\text{pH}_i$ -abhängigen Seitenketten (gelb) im  $\text{pH}_i$ -aktivierten 'gehobenen'-Kanalzustand, PDB-ID: 4BW5 [Dong et al., 2015], rechts). In gesenkter Konformation (PDB-ID: 4XDJ [Dong et al., 2015], links) zeigen sich die absolut zustandsabhängigen Cystein-Seitenketten weitestgehend zugänglich und die Membranfenestrierung geöffnet.

Nach den postulierten Kristallstrukturen des TREK2-Kanals ist, bei einem strukturellen Übergang, die Drehbewegung der unteren M4-Segmentregion mit einer ausladenden Auf- und Abwärtsbewegung verbunden, wohingegen das M2-Segment lediglich leicht rotiert und die Proteinstruktur im Bereich des M3-Segmentes eher starr wirkt. Die Strukturen können somit in Einklang mit den gewonnenen elektrophysiologischen Daten gebracht werden (Abbildung 36). Zur Visualisierung zeigt Abbildung 38 die Bewegungen der intrazellulären Porensegmente in der vereinfachten, kontrastmarkierten Darstellung einer Untereinheit.

Sich stark bewegende Segmentregionen sind dunkel und rigide Bereiche hell dargestellt. Elektrophysiologische und Kristallstrukturdaten zeigen die dominanteste Veränderung in der Ausrichtung des M4-Segmentes. Aus der gesenkten Konformation bewegt sich die M4-Helix links-drehend in die geöffnete Membran-Fenestration der Proteinstruktur und verschließt so den seitlichen Zugang zur Lipidmembran. Die untere M2-Helix dreht sich dabei weniger stark und gegenläufig zu M4 in eine angehobene Position, sodass eine deutlich kompaktere Proteinstruktur (gehobener Zustand) mit geschlossener Fenestrierung entsteht. Der  $\text{pH}_i$ -aktivierte, gehobene Zustand der Kanalstruktur konnte zudem elektrophysiologisch durch einen Affinitätsverlust der NFX-Inhibition bei sterisch eingeschränktem Zugang zur Bindungsstelle in der seitlichen Fenestrierung bei  $\text{pH}_i 5$  bestätigt werden.



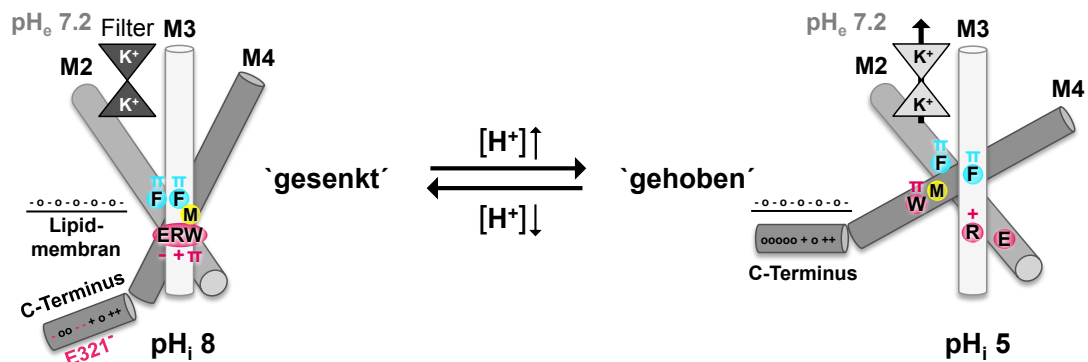
**Abbildung 38:** Kontrastmarkiertes Schema der pH<sub>i</sub>-induzierten Segmentbewegung (dunkel: stark, hell: gering) einer TREK1-Untereinheit. Gesenkte Konformation (links), Bewegungsmodell (zentral) und gehobene Anordnung (rechts), zeigen starke Bewegung des M4-Segmentes mit ausladender Auf- und Abbewegung während der M4-Rotation. Zudem leichte M2-Verlagerung bei Drehbewegung des M2-Segments und weitgehend starre Struktur im Segment M3. Der Selektivitätsfilter (Filter, Dreiecke) leitet Kalium (K<sup>+</sup>) in Auswärtsrichtung (Pfeil) in gehobener pH<sub>i</sub> 5-Kanalstruktur.

## 4.2 Die funktionell kritischen Regionen des TREK1-Kanals

### 4.2.1 Manipulation der Domänentriade über primäre und sekundäre pH<sub>i</sub>-Sensoren

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit brachten die gehobene Konformation des TREK-Kanals direkt mit seinem leitenden, pH<sub>i</sub> 5 aktivierten Zustand in Verbindung. Der Grundzustand des Kanals bei pH<sub>i</sub> 8 konnte entsprechend mit der gesenkten TREK-Konformation assoziiert werden. Wenn auch der native Proteinzustand aus Kristallstrukturen nur abgeschätzt werden kann, so zeigten die elektrophysiologischen Daten doch große Übereinstimmungen mit den Strukturmodellen des TREK2-Kanals (PDB-ID: 4XDJ/4BW5 [Dong et al., 2015]). Mutationen der TREK1-E208<sup>-</sup>, -R222<sup>+</sup> und -W310 nach Cystein zeigten stets dauerhaft aktive Phänotypen und destabilisierten den Grundzustand des TREK1 derart stark, dass der Übergang in eine inaktive Kanalkonformation nicht länger möglich war. Die Betrachtung der Lokalisation dieser drei funktionellen Seitenketten im nicht-leitenden Grundzustand der Kanäle offenbarte eine domänenübergreifende Interaktion der Porensegmente M2, M3 und M4 einer Untereinheit, in der sogenannten ERW-Interaktionstriade (Abbildung 39, pH<sub>i</sub> 8).

Protonierung der C-terminalen Glutamate des Protonensensors TREK1-E321<sup>-</sup> verbessert die Membraninteraktion des C-Terminus und induziert so die Aufwärtsbewegung des unteren M4-Abschnittes. Die stabilisierende Interaktion der E<sup>-</sup>R<sup>+</sup>W<sup>π</sup>-Triade wird aufgelöst und der Kanal so in einen leitenden, gehobenen Kanalzustand überführt. Modifikationen an den ERW-umliegenden Isoleucinen (TREK1-I204, -I221, -I223 und -I224, Abbildung 32B) verhindern die Inaktivierung der TREK1-Kanäle. Eine detaillierte Untersuchung des zentral in der ERW-Triade lokalisierten TREK1-I204 zeigte eine zustands- und MTS-abhängige sterische Hinderung der ERW-Interaktion unter Verwendung von MTS-Reagenzien verschiedener Molekülgrößen und Eigenschaften (Abbildung 27F+G).



**Abbildung 39:** Schematische Darstellung der Stabilisierung des inaktiven TREK1-Kanals. Ionische- $\pi$ -Interaktion bei  $\text{pH}_i$  8 in gesenkter Konformation (links, rot). Protonierung der  $\text{E}^- \text{R}^+ \text{W}^\pi$ -Triade, sowie der C-terminalen Glutamate des Protonensensors TREK1-E321 $^-$ , hebt die Domäneninteraktion auf. Die Interaktion mit der negativ geladenen Lipidmembran führt zu einer Verlagerung der Segmente zu gehobener Helixanordnung (rechts). TREK1-F200, -F229 (cyan) und -M306 (gelb) stabilisieren den inaktiven Zustand des TREK1-Kanals (links) oberhalb der ERW-Triade (rot).

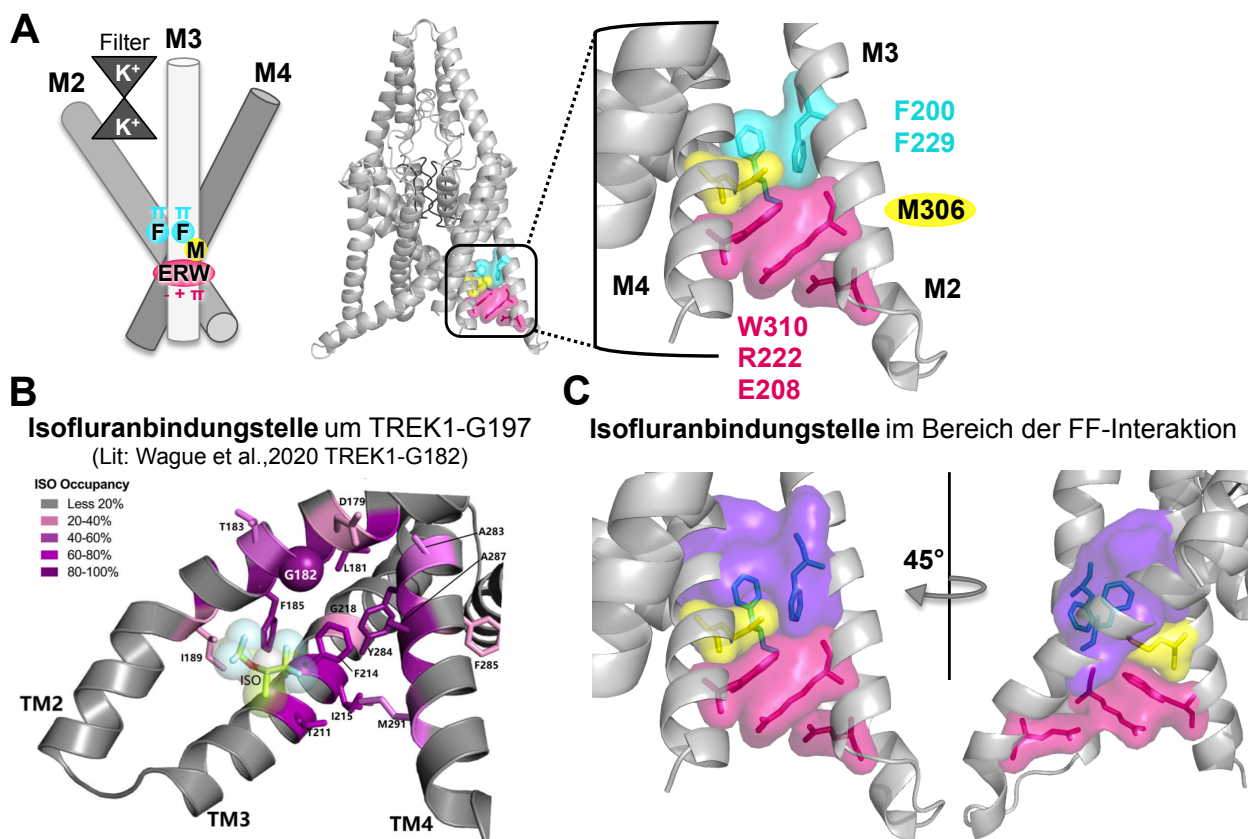
Die hier gewonnenen Daten deuten auf eine sensorische Beteiligung des TREK1-E208 $^-$  an der  $\text{pH}_i$ -Regulation. Protonierung schwächt die ionische  $\text{E208}^- \text{R222}^+$ -Wechselwirkung und begünstigt die Öffnung der, für die Stabilisierung des Grundzustandes, fundamentalen ERW-Triade, deren Funktion nach Substitution des TREK1-E208 $^-$  durch das ebenfalls negativ geladene Aspartat ( $\text{D}^-$ ) erhalten blieb. Zudem deutet die erhöhte Grundaktivität des TREK1-E208-benachbarten -D209C, auf eine dem primären Sensor TREK1-E321 $^-$  ähnliche Beteiligung benachbarter, negativ geladener Aminosäuren (E320 $^-$  und E324 $^-$ ). TREK1-D209-analoge Seitenketten in direkter Nähe zur TREK/TRAAK konservierten ERW-Triade, variieren in ihren Eigenschaften (A,  $\text{K}^+$ ) und könnten so einen Beitrag zur Feinregulation der  $\text{pH}_i$ -Aktivierung der TREK/TRAAK-Subfamilie liefern.

Sowohl dem primären, als auch dem sekundären  $\text{pH}$ -sensorischen Glutamat, sind zudem Seitenketten positiver Ladung vorgelagert. Das C-terminale Lysin (analog TREK-K219) wurde bereits als potentiell beteiligte Seitenkette identifiziert ([Woo et al.,2018]). Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten dies aber weder bestätigen noch widerlegen, da die Cystein-mutierte Seitenkette weder eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit aufwies, noch modifizierbar war. Das dem sekundär sensorischen Glutamat vorausgehende Lysin (TREK1-K206), zeigte dagegen eine deutliche Destabilisierung des Grundzustandes nach Cystein-Substitution, war aber ebenfalls nicht modifizierbar. Eine Beteiligung dieser Seitenketten ist demnach nicht auszuschließen und weiterhin zu klären.

Zusätzlich zu der Stabilisierung des Grundzustandes durch die Interaktionstriade der drei intrazellulären Porenssegmente M2, M3 und M4, zeigten die Ergebnisse dieser Dissertation eine kritische Region um das funktionelle TREK1-F200, lokalisiert über der ERW-Triade des TREK1-Kanals. Die nahezu parallele Ausrichtung der TREK1-F200 und -F229 (Abbildung 39, cyan) im gesenkten Kanalzustand suggeriert eine Stabilisierung des Grundzustandes durch  $\pi - \pi$ -Wechselwirkung. Diese Erkenntnisse wurden durch kürzlich veröffentlichte MD-Simulationen bestätigt, wonach diese Wechselwirkung im gesenkten Zustand des TREK1-Kanals höchst wahrscheinlich ist ([Wague et al.,2020]). Weitere Publikationen postulieren eine relevante Rolle des TREK1-F200 im Rahmen der Kanalregulation, beispielsweise durch mechanischen Stress ([Dong et al.,2020]) oder pharmakologische Modulatoren ([Pope et al,2018]).

Die absolute Abschirmung der Cysteine am dauerhaft aktiven TREK1-F200C-Kanal durch pH<sub>i</sub> 5, offenbarte eine strukturelle Bewegung bei gleichzeitig kaum veränderter Stromgröße aus pH<sub>i</sub> 8. Cystein-Substitution oder MTSET<sup>+</sup>-Modifikation in der Umgebung des TREK1-F200 störten ebenfalls die inaktive Kanalkonformation und aktivierten die Kanäle dauerhaft (Abbildung 31). Strukturell war besonders TREK1-M306 von Interesse, da diese Seitenketten inmitten der FF-Interaktion und der ERW-Triade lokalisiert sind (Abbildung 39 und 40, gelb) und so ein stabilisierender Effekt auf die gesenkte Konformation nahelegend ist.

Die Annahme dieser stabilisierenden Interaktionen wurde zudem durch die nun publizierte Bindungsstelle von Isofluran am TREK1-Kanal untermauert ([Wague et al.,2020]). Die Arbeitsgruppe identifizierte eine Reihe von beteiligten Seitenketten in der unmittelbaren Umgebung der FF-Interaktion. Es konnte zwar keine Bewegung des M4-Segmentes im Rahmen der Simulation nachgewiesen werden, die Aktivierung der Kanäle impliziert jedoch eine Begünstigung des gehobenen Kanalzustandes. Bindung von Isofluran in dieser kritischen Region stört offenbar die FF-Interaktion, beeinflusst zudem TREK1-M306 ([Wague et al.,2020]) und destabilisiert so den inaktiven Kanalzustand oberhalb der ERW-Triade (Abbildung 40A,B+C, violett).

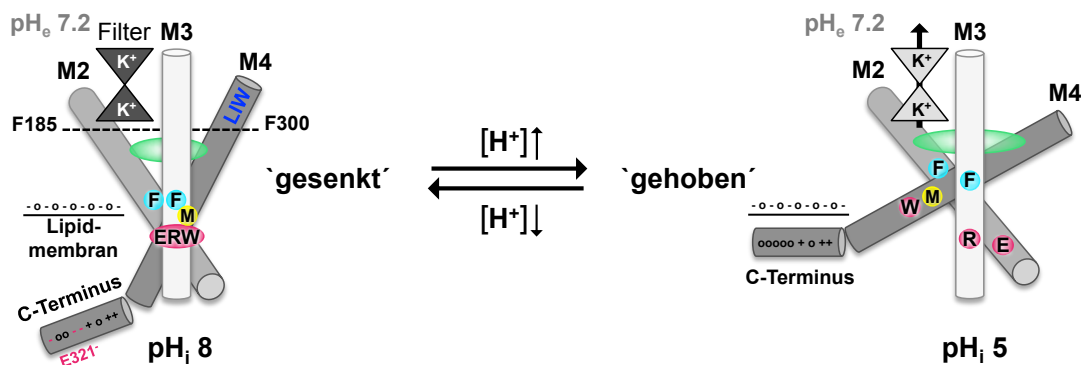


**Abbildung 40:** Isofluranbindung und -Destabilisierung des inaktiven TREK1-Kanals. **A:** Ionische- $\pi$ -Interaktion der ERW-Triade (rot) in schematischer, frontaler und vergrößelter Ansicht der gesenkten Konformation. TREK1-F200, -F229 (cyan) und -M306 (gelb) stabilisieren den inaktiven Zustand des TREK1-Kanals oberhalb der ERW-Interaktion. **B:** Originalabbildung der MD-Simulationsergebnisse zur Bestimmung der Bindungsstelle von Isofluran ([Wague et al.,2020]). **C:** Markierung aller Seitenketten mit mehr als 80% Besetzung während der Simulationszeit nach Wague et al. (violett). Darstellung und Markierungen in analoger Weise zu A und Drehung der vergrößerten Frontalansicht (links) um 45 Grad (rechts).

### 4.2.2 Die kritischen Regionen um den Selektivitätsfilter

Cystein-Substitutionen der seitlich des Selektivitätsfilters lokalisierten TREK1-W290, -I293 und -L297 (M4), zeigten stark erhöhte basale Offenwahrscheinlichkeiten und somit einen destabilisierenden Effekt der eingeführten Cysteine auf die Proteinstruktur des TREK1-Kanals. Seitenketten aufwärts des TREK1-F300 (M4), sowie des -F185 (M2) waren mittels MTSET<sup>+</sup> nicht modifizierbar, sodass Modifikationseffekte auf diese unzugänglichen Seitenketten nicht detektierbar waren (Abbildung 41, links, LIW, L<sub>297</sub>I<sub>293</sub>W<sub>290</sub>, blau).

Die modifizierbaren Cystein-Seitenketten der TREK1-G186, -L189 (M2) und -A301 (M4)-Kanäle liegen, alle in einer Ebene unterhalb des Selektivitätsfilters und zeigten stark veränderte Sensitivität gegenüber intrazellulären pH-Veränderungen (Abbildung 41, grün markierte Region). Der Cystein-substituierte TREK1-G186-Kanal, bildete die Ausnahme und wies lediglich eine leicht erhöhte Offenwahrscheinlichkeit von etwa 15 % auf. TREK1-A301C zeigte jedoch drastisch verändertes pH<sub>i</sub>-Verhalten, mit maximaler Aktivierung durch pH<sub>i</sub> 6 und einer basalen relativen Offenwahrscheinlichkeit von 42 (A301C) %. Die bereits erhöhten, basalen Offenwahrscheinlichkeiten steigerten sich nach MTSET<sup>+</sup>-Modifikation dieser Kanalmutationen bis zu völligem Verlust der pH<sub>i</sub>-Regulierbarkeit. Inwiefern dies sterischen Einflüssen oder direkten Selektivitätsfilter-Interaktionen zuzuschreiben ist, wie im Sonderfalle des TREK1-L189C, bleibt im Detail zu untersuchen.



**Abbildung 41:** Dauerhafte Stimulation des TREK1-Kanals durch MTSET<sup>+</sup>-Modifikation unterhalb des Selektivitätsfilters (grün), sowie die unzugänglichen Aminosäuren TREK1-W290, -I293 und -L297 (LIW, blau), oberhalb der Modifikationsgrenze (TREK1-F185 und -F300). Mit ERW- (rot), FF- (cyan) und TREK1-M306-Lokalisation (gelb) in gesenkter (links) und gehobener Helixkonformation (rechts), sowie der Aufweitung der modifizierbaren Ebene (grün) und dessen Annäherung an den regulierenden Selektivitätsfilter durch pH<sub>i</sub> 5 (rechts).



### 4.3 Modell zur allosterischen Übertragung von $\text{pH}_i$ -Signalen in der TREK/TRAAK-Subfamilie

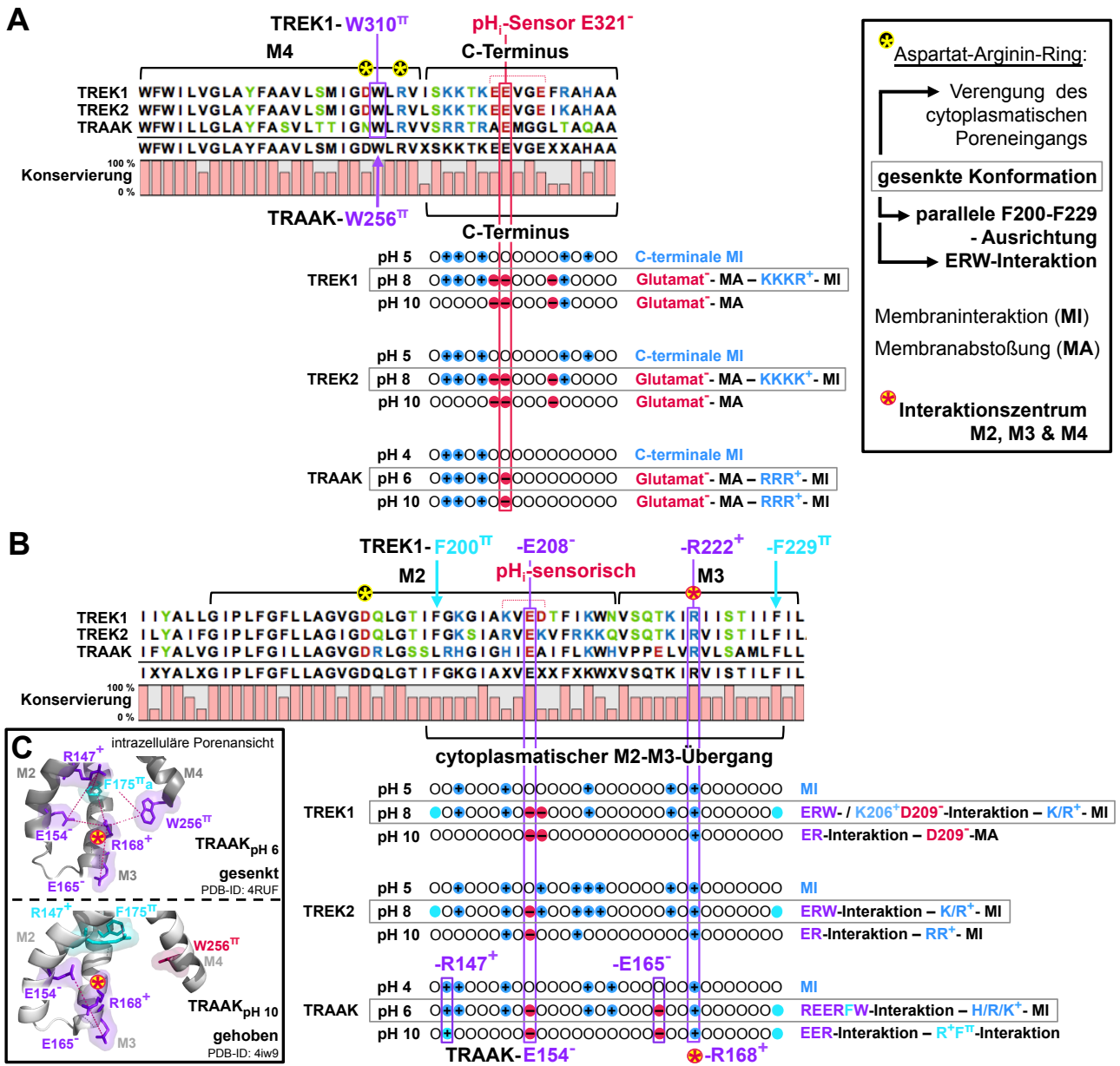
Die Protonierungen des primären  $\text{pH}_i$ -Sensors TREK1-E321<sup>-</sup>, wie auch des sekundär sensorischen TREK1-E208<sup>-</sup>, verändern die Proteininteraktionen des Grundzustandes und heben die Interaktion der  $\text{E}^- \text{R}^+ \text{W}^\pi$ -Triade auf. Die Porensegmente werden dabei an- und der stabilisierende  $\pi - \pi$ -Effekt der parallelen F200-F229-Ausrichtung, durch Bewegung des TREK1-F200, aufgehoben. Auch die kritische Ebene unterhalb des Selektivitätsfilters bewegt sich während einer  $\text{pH}_i$ -Aktivierung auf die Filterregion zu, doch die eigentliche Signalübertragung auf diese regulierende Einheit des TREK1-Kanals bleibt bisweilen ungeklärt und muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Zhuo et al. [2016] demonstrierten bereits den Einfluss der C-terminalen 2-APB-Aktivierung auf den Selektivitätsfilter des TREK2-Kanals und eine gehinderte Signalweiterleitung durch Mutation eines  $K_{2P}$ -konservierten M4-Glycins, sowie eines nahegelegenen TREK/TRAAK spezifischen Phenylalanins. Die TREK1-analogen Aminosäuren -G296 und -F300 zeigten im Rahmen dieser Arbeit allerdings andere Charakteristika. Die Cystein-Mutation des hochkonservierten TREK1-G296 erwies sich als einzige, sogenannte 'loss of function' Kanalmutation, der 82 Mutationen des TREK1-Kanals, mit äußerst geringen, sehr variablen und nicht TPA-blockierbaren Kaliumströmen. Dies bestätigt auch hier die grundlegende Rolle des konservierten Glycins zur Regulation des TREK1-Kanals. Der Cystein-Austausch des ebenfalls  $K_{2P}$ -konservierten Gelenk-Glycins TREK1-G181 (M2) führte zu intaktem  $\text{pH}_i$ -Verhalten mit stark verminderten Stromantworten. Auch dies stand in Einklang mit der Identifizierung des TREK1-G181 als essentielle Seitenkette der intrazellulären Modulation und zur Kontrolle makroskopischer Ströme in TREK-Kanälen [Zhuo et al.,2017].

Die Analyse des entsprechenden Phenylalanins des TREK1-Kanals ergab keine konkreten Hinweise auf eine funktionelle Rolle des TREK1-F300. Allerdings stellten die Cystein-Mutationen des TREK1-F300 (M4), wie auch des TREK1-F185 (M2), welche direkt unterhalb des Selektivitätsfilters lokalisiert sind, die Erreichbarkeitsgrenzen für  $\text{MTSET}^+$  dar. Die Lage und Orientierungen in den TREK2-Proteinstrukturen suggerieren eine Stabilisierung der unteren Bereiche der Porendomänen. TREK1-F185 ist zu dem ersten Threonin des P1-Filtermotivs (-TTxGFG-) orientiert und mit einer Distanz von etwa 5 Å in Interaktionsnähe. Das analoge Threonin des P2-Segmentes könnte, anhand der Kristallstruktur, durch das TREK1-F300 koordiniert sein. Das obere M2-Segment stellt sich bei Konformationsänderungen eher starr dar, wodurch sich die Distanz einer möglichen T156-F185-Interaktion während des Übergangs in den postulierten TREK2-Modellen (PDB-ID: 4BW5/4XDJ [Dong et al.,2015]) kaum ändert. Die ausladende Bewegung des M4-Segments beim Übergang von der gehobenen Struktur, in die gesenkte Form mit inaktivem Selektivitätsfilter, entfernt aber das TREK1-F300 (M4) aus dem Bereich des koordinierten TREK1-T265 (P2). Die Distanz erweitert sich von etwa 5 Å im leitenden Zustand, auf 10 Å in der inaktiven Konformation der gesenkten Struktur. Ein solcher Mechanismus der Filterstabilisierung zur Signaltransduktion auf den Selektivitätsfilter ist durchaus denkbar, bisweilen aber lediglich anhand der Kristallstrukturen zu belegen. Der Übertragungsverlust der C-terminalen Signale nach Alanin-Substitution des TREK1-F300-analogen M4-Phenylalanins des TREK2-Kanals [Zhuo et al.,2016], deutet aber auf eine fundamentale, regulatorische Rolle dieses Phenylalanins.

Auch wenn die eigentliche Übertragung der C-terminalen Signale auf den Selektivitätsfilter noch nicht abschließend geklärt werden konnte, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei funktionelle Interaktionsbereiche TREK/TRAAK-konservierter Aminosäuren identifiziert, die ERW-Domänentriade, sowie die TREK1-F200<sup>π</sup>-F229<sup>π</sup>-Interaktion der gesenkten Konformation des Grundzustandes. Abbildung 42 zeigt einen Sequenzvergleich mit prozentualer Konservierung der Seitenketten der porenformenden Bereiche der TREK/TRAAK-Subfamilie, sowie den Ladungszustand der titrierbaren Aminosäuren in den aktiven Zuständen (TREK1/2: pH 5 und 10; TRAAK: pH 4 und 10) und in nicht-leitenden Kanalstrukturen (TREK1/2: pH 8; TRAAK: pH 6). Gelb-schwarze Sterne markieren dabei den cytoplasmatischen Poreneingang der Kanäle im weitgehend konservierten Aspartat-Argin-Ring (TREK1-D194, -D309 und -R312).

Ein Vergleich der Sequenzen des M4-Segmentes, sowie des proximalen C-Terminus zeigt eine hohe Konservierung dieser Region innerhalb der TREK/TRAAK-Subfamilie. Die meisten Abweichungen finden sich im C-terminalen Bereich des TRAAK-Kanals (Abbildung 42A). Die hier durch Arginine ( $R^+$ , blau) ersetzten Lysine ( $L^+$ , blau) erhalten ihre positive Ladung auch bei sehr niedrigen pH-Werten wie  $pH_i$  10, wohingegen eine Lysin-Membraninteraktion (MI) bei TREK1- und TREK2-Kanälen aufgehoben wird und eine Membranabstoßung (MA) durch Glutamat-Phospholipid-Abstoßung vorherrschend die Lage des C-Terminus bestimmt. Bei annähernd neutralem pH-Wert (TREK1/2:  $pH_i$  8, TRAAK:  $pH_i$  6) sind sowohl MI durch  $RK^+$ -Phospholipid-Interaktionen (blau), als auch eine MA durch die negativ geladenen Glutamate ( $E^-$ , rot) um den C-terminalen  $pH_i$ -Sensor TREK1-E321<sup>-</sup> (rot, Kasten) möglich. Durch sehr hohe Protonenkonzentrationen (TREK1/2:  $pH_i$  5, TRAAK:  $pH_i$  4) werden die Glutamate protoniert und reine  $K^+$ - $R^+$ -MI sind die Folge, wodurch ein leitender Kanalzustand gehobener Helices induziert wird (Abbildung 12 und 37).



**Abbildung 42:** Sequenz- und pH-Zustandsvergleich bei intrazellulärer Aktivierung der TREK/TRAAK-Subfamilie (TREK1/2: pH 5, 6 und 8; TRAAK: pH 4, 6 und 10). Alle polaren Seitenketten sind hierbei stets grün, negativ geladene rot und Seitenketten positiver Ladung blau hervorgehoben. In niedrig aktiven Zustand (graue Kästen, TREK1/2: pH 8; TRAAK: pH 6) zeigte sich im TREK1-Kanal eine parallele F200-F229-Ausrichtung (cyan), sowie die ERW-Domäneninteraktion (violett) zur Stabilisierung des gesenkten Kanalzustandes. **A:** Hohe Konservierung des M4-Segementes, sowie des proximalen C-Terminus der TREK/TRAAK-Kanäle, mit dem funktionell kritischen TREK1-W310 (violett) und dem primären pH<sub>i</sub>-Sensor TREK1-E321<sup>-</sup> (rot). **B:** Sequenzvergleich von M2 und dem porenformenden, unteren M3-Segment zwischen den interagierenden aromatischen Seitenketten TREK1-F200<sup>T</sup> und -F229<sup>T</sup> (cyan), mit TREK1-E208<sup>-</sup> und -R222<sup>+</sup> als Teil der pH<sub>i</sub>-sensitiven ERW-Domänen-teride (violett). **C:** Erweiterte Domäneninteraktionen in den postulierten Zuständen des TRAAK-Kanals (PDB-ID: 4RUF [Lolicato et al.,2014], oben, pH<sub>i</sub> 6 und 4iw9 [Brohawn et al.,2013], unten, pH<sub>i</sub> 10), mit zusätzlicher Koordination des zentralen TRAAK-R168<sup>+</sup> und des -W256<sup>T</sup> durch -R147<sup>+</sup> und -E165<sup>-</sup> im gesenkten Kanalzustand (pH<sub>i</sub> 6, oben).

Abbildung 42B zeigt diesen Vergleich analog zu Abbildung 42A für den cytoplasmatischen Übergang von M2 zu M3, zwischen den stabilisierenden Phenylalaninen TREK1-F200<sup>π</sup> und -F229<sup>π</sup> (cyan). Die beteiligten Seitenketten der  $pH_i$ -sensorischen ERW-Triade TREK1-E208<sup>-</sup> und R222<sup>+</sup>, sowie -W310<sup>π</sup> (M4, Abbildung 42A) wurden mit violetten Kästen hervorgehoben und das mediale TREK1-R222<sup>+</sup> als Interaktionszentrum von M2, M3 und M4 zusätzlich markiert (rot-gelbe Sterne). Auch hier könnten hohe Protonenkonzentrationen alle ionischen Proteininteraktionen aufheben und MI der ausschließlich positiv geladenen Seitenketten führen dann zum Übergang in die gehobene Kanalstruktur. Bei der Betrachtung neutraler und hoher pH-Werte erklären sich nun die initial präsentierten Unterschiede, der vorwiegend sauren Aktivierungen der TREK1/2-Kanäle, sowie der basischen Aktivierung der TRAAK-Ströme (Abbildung 12). TREK1- und TREK2-Kanäle zeigen bei nahezu neutralem  $pH_i$ -Wert die Interaktion der E<sup>-</sup>R<sup>+</sup>W<sup>π</sup>-Domänentriade, sowie mögliche K/R<sup>+</sup>-MI und im Falle des TREK1-Kanals eine zusätzliche Stabilisierung des gesenkten Grundzustandes durch eine ionische D209<sup>-</sup>-K206<sup>+</sup>-Interaktion in unmittelbarer Nähe der ERW-Triade. Erniedrigung des pH-Wertes auf  $pH_i$  10 deprotoniert alle Lysine und könnte so zu einer reinen Arginin-MI führen. Die ERW-Interaktion würde dabei geschwächt und die Kanäle in leitende Zustände überführt werden. TREK1-D209<sup>-</sup> würde von der Lipidmembran abgestoßen, wohingegen im TREK2-Kanal eine Arginin-MI möglich bliebe und so die prominentere basische Aktivierung erklärbar wäre.

Im TRAAK-Kanal suggerieren Sequenz- und Strukturvergleiche eine zusätzliche Koordinierung der ERW-Triade (TRAAK-E154<sup>-</sup>-R168<sup>+</sup>-W265<sup>π</sup>) durch TRAAK-R147<sup>+</sup> und -E165<sup>-</sup> in gesenktem Kanalzustand (Abbildung 42C, oben, violett, PDB-ID: 4RUF [Lolicato et al.,2014]), welcher hier  $pH_i$  6 entspricht. TRAAK-F175<sup>π</sup> (cyan) ist hier medial zwischen TRAAK-R147<sup>+</sup> und -E154<sup>-</sup> lokalisiert und könnte sich stabilisierend auf die REERW-Interaktion (violett, TRAAK-R147<sup>+</sup>-E154<sup>-</sup>-E165<sup>-</sup>-R168<sup>+</sup>-W265<sup>π</sup>) auswirken. Zudem sind hier zusätzliche Histidin- (H<sup>+</sup>), sowie R/K<sup>+</sup>-MI möglich. Ein  $pH_i$ -Wert von 10 deprotoniert sowohl die Lysine, als auch die Histidine des TRAAK-Kanals und die verbleibenden zwei Arginine zeigen sich nicht membranorientiert, sondern werden innerhalb des Proteins koordiniert. Die gehobene Struktur des TRAAK-Kanals offenbart eine mögliche Wechselwirkung des TRAAK-R147<sup>+</sup> mit -F175<sup>π</sup> (Abbildung 42C, unten, cyan, PDB-ID: 4iw9 [Brohawn et al.,2013]), sowie die ionische Interaktion von TRAAK-E154<sup>-</sup>-E165<sup>-</sup> und R168<sup>+</sup> (EER), zur Stabilisierung des Interaktionszentrums TRAAK-R168<sup>+</sup> (rot-gelbe Sterne). Die Lageveränderungen des TRAAK-R147<sup>+</sup>, sowie im Besonderen des zentralen TRAAK-R168<sup>+</sup>, machen eine TRAAK-R168<sup>+</sup>-W256<sup>π</sup>-Wechselwirkung unmöglich und ein stark leitender Zustand durch basische Stimulation des TRAAK-Kanals wäre die Folge.

Kurz gesagt werden die gesenkten Grundzustände innerhalb der TREK/TRAAK-Subfamilie offenbar vorwiegend durch proteininterne Wechselwirkungen der ERW- (TREK1/2), beziehungsweise REERFW- (TRAAK) Domäneninteraktion stabilisiert. Deprotonierung stärkt die TREK1-E208<sup>-</sup>-R222<sup>+</sup>- (TRAAK: E<sup>-</sup>-E<sup>-</sup>-R<sup>+</sup>) und schwächt die R222<sup>+</sup>-W310<sup>π</sup>-Interaktion, sodass ein gehobener Zustand der Kanäle induziert wird. Protonierung der negativ geladenen Seitenketten hebt deren Proteininteraktionen auf, sodass die verbleibenden MI ebenfalls die gehobene, leitende Proteinstruktur begünstigen. Zudem könnte die Koordination des zentralen TRAAK-R168<sup>+</sup> durch zwei Glutamate die Stabilität der Kanäle im gehobenen Kanalzustand maßgeblich verbessern und so für die prominente Aktivierung der TRAAK-Kanäle im basischen Milieu sorgen.

#### 4.4 Die $pH_i$ -Aktivierung in $K_{2P}$ - und anderen Ionenkanälen

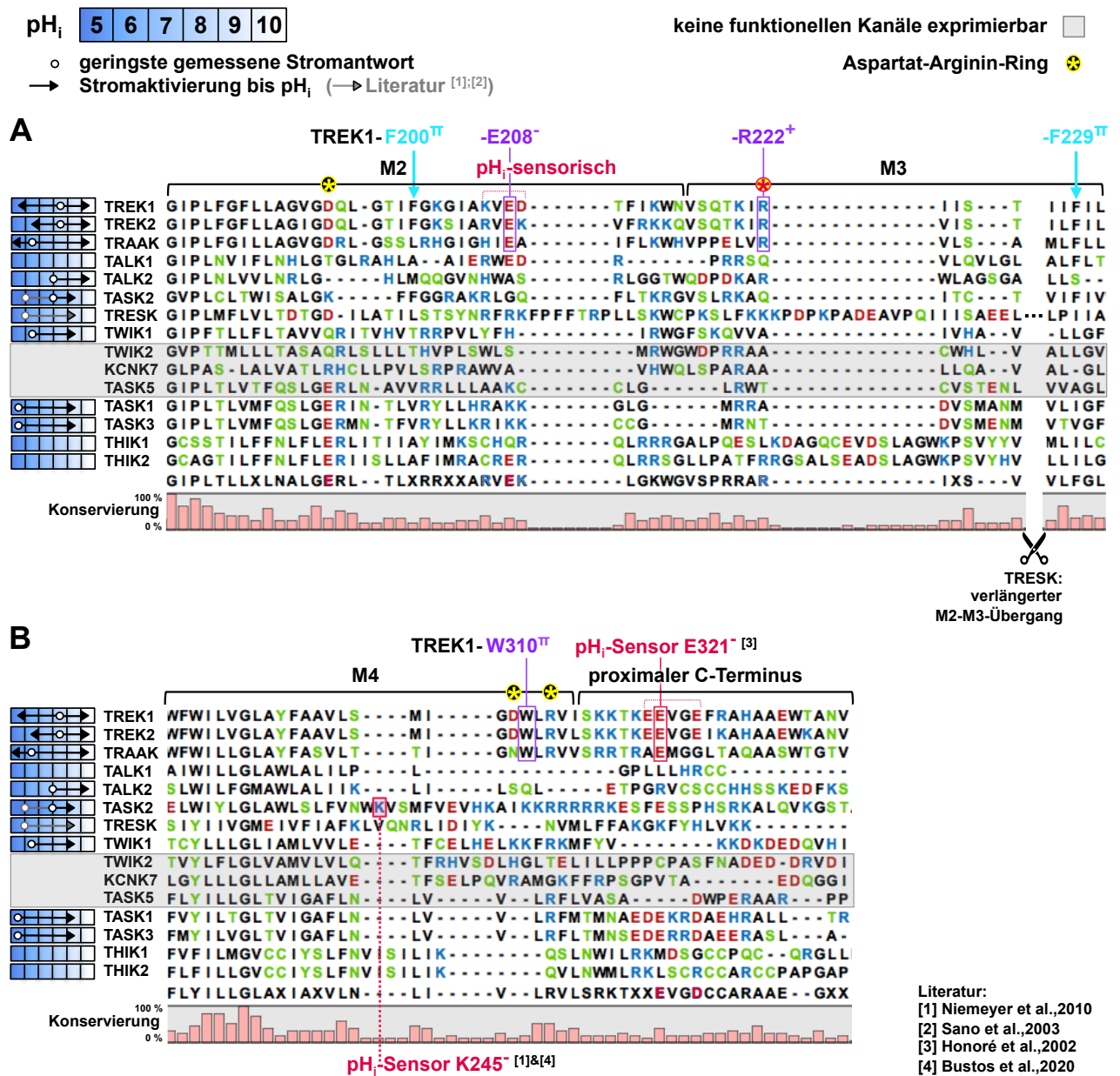
Entgegen den bisher veröffentlichten Literaturangaben zeigten sich in den Experimenten der Arbeitsgruppe Baukrowitz alle bisher untersuchten  $K_{2P}$ -Kanäle als  $pH_i$ -sensitiv (unpublizierte Ergebnisse). Die bereits ausführlich behandelten Kanäle der TREK/TRAAK-Subfamilie, sowie TWIK-1- [Lesage et al.,1996], TWIK2- [Chavez et al.,1999], TASK2- [Niemeyer et al.,2010] und TRESK-Kanäle [Sano et al.,2003] sind bereits als sensitiv beschrieben, wohingegen TASK1-, TASK3-, TALK1-, TALK2-(TASK4-), THIK1- und THIK2-Kanäle [Feliciangeli et al.,2015] bis heute als insensitiv gegen intrazelluläre  $pH$ -Veränderungen gelten.

Abbildung 43 zeigt den Sequenzvergleich der porenbildenden Regionen der  $K_{2P}$ -Kanäle, zusammen mit dem  $pH$ -Wert der maximal gemessenen Aktivierung der Kanäle (Pfeile) aus dem Zustand niedrigster gemessener Stromgröße (Kreise) auf einer Skala von  $pH_i$  5 bis 10. Mit Ausnahme der bidirektional stimulierbaren TREK/TRAAK-Subfamilie, zeigten alle untersuchten  $K_{2P}$ -Kanäle eine Stromzunahme bei sinkender Protonenkonzentration. Um eine leichtere Übersicht zu gewährleisten wurde der verlängerte M2-M3-Segmentübergang des TRESK-Kanals ausgeschnitten, sowie die Sequenzen der nicht funktionellen Kanäle TASK5, KCNK7 und TWIK2 (keine Expression in Oozyten-Experimenten der AG Baukrowitz) grau hinterlegt. Der Sequenzvergleich zeigt vornehmlich hohe Konservierung (Balken, orange) für Aminosäure-Seitenketten der ersten M2- und M4-Windungen. Tiefer lokalisierte Seitenketten sind nur noch vereinzelt konserviert.

TWIK- und TASK2-Kanäle weisen viele titrierbare Aminosäureseitenketten am Ende von M4 und im proximalen C-Terminus auf. Das Fehlen negativ geladener Seitenketten in M2 und M3 zeigt, dass saure Aminosäuren in dieser Region keine generelle Notwendigkeit für die  $pH_i$ -Regulation der  $K_{2P}$ -Kanäle darstellen. Im TASK2-Kanal ist der  $pH_i$ -Sensor bereits identifiziert. Protonierung eines einzelnen Lysins am M4-Segmentende überführt den Kanal in den niedrig-aktiven Zustand und öffnet und schließt auch hier die seitlichen Membranfenestrationen ([Niemeyer et al.,2010, Bustos et al.,2020], Abbildung 43B, rot). Die Proteinstrukturen des TASK2-Kanales (PDB-ID: 6wlv/6wm0 [Li et al.,2020]) zeigen positiv geladene oder polare Seitenketten an analoger Position zur ERW-Triade des TREK1-Kanals, die Phenylalanine der FF-Interaktion, sowie TREK1-M306, sind aber im TASK2-Kanal konserviert. Zusammen mit den für TASK-Kanäle bereits postulierten Wirkungsstellen für Anästhetika, analog zu TREK1-F200, -T226 und -M306 ([Wague et al.,2020]), legt dies einen ähnlichen Mechanismus zur Stabilisierung des inaktiven Kanalzustandes nahe.

TALK2-(TASK4), TRESK-, TASK1- und TASK3-Kanäle weisen sowohl im M2 als auch im M3-Segment titrierbare Aminosäure-Seitenketten auf. Durch den hohen Konsens der proximalen C-Termini von TREK/TRAAK- und TASK-Kanälen, könnten diese somit ähnlich der TREK/TRAAK-Subfamilie reguliert werden. Der TRESK-Kanal enthält allerdings nur positive Ladungen im proximalen C-Terminus, sodass eine MI ähnlich der TREK/TRAAK-Kanäle nicht denkbar ist. Stattdessen finden sich hier zwei negative Ladungen im M4-Segment. Der unter den  $K_{2P}$ -Kanälen einzigartige, verlängerte M2-M3-Übergang, welcher eine Reihe von positiv und negativ geladenen Seitenketten enthält (in Abbildung 43 ausgeschnitten), legt hier zudem einen veränderten Mechanismus der  $pH_i$ -Regulation nahe.

TALK1- und THIK-Kanäle enthalten vergleichsweise wenige Ladungen und keine Glutamate in M4 oder im proximalen C-Terminus, wodurch eine  $pH_i$ -Regulation ähnlich der TREK/TRAAK-Aktivierung nicht möglich ist. Eine Reihe geladener Seitenketten in M2 und M3 könnten hier ursächlich für eine potentielle  $pH_i$ -Sensitivität von TALK1- und THIK-Kanälen sein, welche bisher aber experimentell noch nicht bestätigt wurde.



**Abbildung 43:** Sequenzvergleich der porenbildenden Seitenketten sowie des proximalen C-Terminus aller 15 humanen  $K_2P$ -Kanäle. Links, deren Aktivierung aus der jeweils niedrigsten, gemessenen Stromgröße auf einer Skala von  $pH_i$  5 bis 10 (blau hinterlegt). Polare Seitenketten sind grün, negativ geladene rot und Residuen mit positiver Ladung blau eingefärbt. **A:** Vergleich von M2 und dem Übergang zu M3 zwischen TREK1-G181 und -L231. Zwei der funktionellen Seitenketten der  $pH_i$ -sensorischen ERW-Triade (violett) mit TREK1-E208<sup>-</sup> und dem Interaktionszentrum um TREK1-R222<sup>+</sup> (rot-gelber Stern), sowie die Positionen der stabilisierenden TREK1-F200-F229- $\pi$  -  $\pi$ -Wechselwirkung (cyan) sind dabei hervorgehoben. **B:** Aminosäuresequenzen der M4-Segmente aller 15  $K_2P$ -Kanäle, sowie deren proximalen C-Termini, mit Markierung des TREK1-W310<sup>TT</sup> (violett) der ERW-Triade und dem C-terminalen  $pH_i$ -Sensor TREK1-E321<sup>+</sup> (rot) [Honoré et al.,2002]. Der bereits beschriebene intrazelluläre pH-Sensor des TASK2-Kanals TASK2-K245<sup>+</sup> wurde ebenfalls rot hervorgehoben. Die drei Seitenketten der ERW-Triade (violett) sind lediglich innerhalb der TREK/TRAAK-Subfamilie konserviert, eine Unterstützende F <sup>$\pi$</sup> -F <sup>$\pi$</sup> -Interaktion (cyan) wäre anhand der Sequenzen auch im TASK2-Kanal denkbar.

Da ein Sequenzvergleich lediglich einen Eindruck vermittelt, sind zur abschließenden Aufklärung der intrazellulären pH-Regulation aller  $K_{2P}$ -Kanäle, detaillierte elektrophysiologische Untersuchungen, wie auch die Auflösung der Kristallstrukturen der einzelnen Kanäle unbedingt notwendig.

Im Gegensatz zu  $K_{2P}$ -Kanälen ist die intrazelluläre pH-Regulation von  $K_{IR}$ -Kanälen bereits aufgeklärt. Der cytoplasmatische Poreneingang dieser  $pH_i$ -sensitiven Kanäle mit 2TMD-Struktur wird durch Zusammenlagerung der Porenhelices geschlossen (TM2, 'helix-bundle-crossing') und die ausladenden cytoplasmatischen Dömen dieser tetramer assemblierenden Kanäle formen eine zusätzliche cytoplasmatische Pore. Im Falle der  $pH_i$ -Regulation des  $K_{IR}1.1$ -Kanals zeigte sich ein inter- und intrahelicales Netzwerk aus etwa 50 interagierenden Aminosäuren, welche vorwiegend die geöffnete, aber auch eine voraktivierte Übergangsstruktur stabilisieren. Durch Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes zerfällt das zum Teil titrierbare Netzwerk in deutlich kleinere Bündel und es kommt zur Absenkung der Porenhelices und somit zum Übergang in den inaktiven Kanalzustand [Bollepalli et al.,2014]. Die depolarisierend wirkenden  $K_{IR}$ -Kanäle werden also basisch aktiviert und über ein ausladendes Netzwerk in offener Form stabilisiert, wohingegen TREK/TRAAK-Kanäle durch Aufhebung der Proteininteraktionen des Grundzustandes, sowohl basisch als auch azide reguliert werden können.

Kanäle der 6TMD-Struktur sind nach bisherigem Kenntnisstand insensitiv gegen Veränderungen der intrazellulären Protonenkonzentration. Trotz der großen Anzahl unterschiedlicher  $K_V$ -Kanalvarianten, sowie der BK- und SK-Kanaltypen wurde lediglich ein Einfluss des extrazellulären pH-Wertes auf diese Membranproteine festgestellt. Die  $pH_o$ -sensorischen Seitenketten stabilisieren dabei in der Regel direkt die Selektivitätsfilter. Die cytoplasmatische Regulierung von Kanälen mit 6-TMD-Struktur verläuft ebenfalls über die Öffnung und Verengung des unteren Poreneinganges ('helix-bundle-crossing'). Analog der  $K_{IR}$ -Kanalfamilie (TM2) wird der cytoplasmatische Poreneingang durch die Zusammenlagerung der zweiten Poresegmente (S6-Helices) gebildet, welche häufig mit den Spannungssensoren (S1-S4) an der S4-S5-Schleife verknüpft sind. Die Verengung ist dabei je nach Kanaltypus unterschiedlich stark ausgeprägt [Lui et al,1997; del Camino und Yellen,2001; Flynn und Zagotta,2001; Zhuo et al,2011]. Für den  $K_V1.1$ -Kanal zeigte sich eine domänenübergreifende, ERW-ähnliche, Gatingtriade aus  $K_V1.1$ -E394<sup>-</sup>R395<sup>+</sup> (S4-S5-Linker) und Y485<sup>x</sup> (S6) zur Stabilisierung des spannungsaktivierten Zustandes [Batulan et al.,2010; Chowdhury et al,2014]. Die Kanäle werden über zelluläre und proteineigene Komponenten gesteuert [Barros et al.,2012], wobei der intrazelluläre pH-Wert auf die repolarisierend wirkenden  $K_V$ -Kanäle offenbar keinen direkten Einfluss hat. Dies ist eine mögliche Erklärung für die Co-Lokalisation der beidenseitig auswärtsrektifizierenden  $K_{2P}$ - und  $K_V$ -Kanäle in erregbaren Zellen des Nervensystems. Da eine  $pH_i$ -Aktivierung die Auswärtsrektifizierung der  $K_{2P}$ -Kanäle aufhebt [Schewe et al.,2016], können Schwankungen des intrazellulären pH-Wertes erregbarer Zellen, je nach aktuellem Membranpotential, sowohl Re- als auch Depolarisationen der Zellen auslösen oder unterstützen und vereinen so die Eigenschaften von  $K_{IR}$ - und  $K_V$ -Kanälen.

## 5 Anhang

### 5.1 Verwendete Materialien

#### Lösungen

Messlösungen:

Einstellung der pH-Werte von 10 bis 3 erfolgte mit HCL oder NaOH,  $x > \text{pH } 8$  sofern nicht anders angegeben.

intrazellulär (pH x)	extrazellulär (pH 7.2)
120 mM KCl	4 bzw. 120 mM KCl
10 mM HEPES	10 mM HEPES
2 mM EGTA	3.6 mM CaCl <sub>2</sub>
1 mM Pyrophosphat	

Lösungen für Oozytenpräparation:

Tricainlösung, pH x.x	
5 mM Tricain	1 mM NaHCO <sub>3</sub>
Waschlösung, pH 7.4	
88 mM NaCl	2.4 mM NaHCO <sub>3</sub>
1.0 mM KCl	0.8 mM MgSO <sub>4</sub>
	7.5 mM TRIS/HCl
Inkubationslösung, pH 7.4	
54 mM NaCl	2.4 mM NaHCO <sub>3</sub>
30 mM KCl	0.8 mM MgSO <sub>4</sub>
0.4 mM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	7.5 mM TRIS/HCl
0.3 mM CaCl <sub>2</sub>	

#### Krallenfrösche

- Xenopus Laevis, Glatter Krallenfrosch, Amerika  
1x Frösche (100-150 g)
- Xenopus Borealis, Gelbgefleckter Krallenfrosch, Amerika  
3x Frösche (80-100 g)

#### Externe Sequenzierung

Eurofins, Ebersberg (München)



**Material und Geräte**

	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Amplicap-Kit	T7	Cellscript, Madison (USA)
Borosilicatkapillaren	GB200-8P	Science Products, USA
Borosilicatkapillaren	3.3	Hilgenberg, Malsfeld
Pasteurpipetten	HX78	Roth, Karlsruhe
mMESSAGE mMACHINE-Kit		Ambion, Carlsbad (USA)
Micro Forge	MF-830	Narishige, Japan
Mikromanipulator	ZSS	pythron <sup>®</sup> , USA
Midiprep-Kit		Thermo Scientific, Deutschland
Miniprep-Kit		Thermo Scientific, Deutschland
NanoDrop	ND-1000 Spectrophotometer	peQLab GmbH, Erlangen
Patch-Clamp Mikroskop (invers)	Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Pipetten	Eppendorf Research plus	Eppendorf AG, Hamburg
Puller	P-97	Sutter Instruments Co., USA
Schwingungsgedämpfter Tisch	63530	TMC <sup>TM</sup> Vibration Control, Peabody (USA)
Stereomikroskop	MS5	Leica Microsystems, Wetzlar
Stereomikroskop	ST-36C 6LED	Motic, Wetzlar
Verstärker	EPC 10	HEKA Elektronik, Ludwigshafen/Rhein
Vorverstärker	EPC 10	HEKA Elektronik, Ludwigshafen/Rhein

**Chemikalien**

	<b>Name</b>	<b>CAS</b>	<b>Hersteller</b>
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	Calciumchlorid Dihydrat	10035-04-8	Merck
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	Calciumnitrat Tetrahydrat	13477-34-4	Merck
DMSO	Dimethylsulfoxid	67-68-5	Sigma/Aldrich
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat	67-42-5	Sigma/Aldrich
HCl	Salzsäure	7647-01-0	Roth
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	7365-45-9	Sigma/Aldrich
KCl	Kaliumchlorid	7447-40-7	Roth
MeMTS	Methyl-methanethiosulfonat	2949-92-0	TRC
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat	7487-88-9	Merck
MTSES <sup>-</sup> *Na <sup>+</sup>	Natrium(2-Sulfonatoethyl)methanethiosulfonat	184644-83-5	TRC
MTSET <sup>+</sup> *Br <sup>-</sup>	2-(Trimethylammonium)ethyl-methanethiosulfonat Bromid	91774-25-3	TRC
MTS-TBAO <sup>+</sup> *Br <sup>-</sup>	8-(Tributylammonium)octyl Methanethiosulfonat Bromid	-	TRC
NaCl	Natriumchlorid	7647-14-5	Roth
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat	144-55-8	Roth
NaOH	Natriumhydroxid	1310-73-2	Roth
NFX*HCl	Norfluoxetin Hydrochlorid	57226-68-3	TRC
	Paraffin-Öl	8012-95-1	Sigma/Aldrich
Na-PP*10H <sub>2</sub> O	Natrium-Pyrophosphat Decahydrat	13472-36-1	Sigma/Aldrich
TPenA <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>	Tetrapentyl-Ammonium Chlorid	4965-17-7	Sigma/Aldrich
Tricain	Ethyl-3-aminobenzoat-Methansulfonat	886-86-2	Sigma/Aldrich
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	77-86-1	Roth

**Verwendete Software**

<b>Programm</b>	<b>Entwickler</b>
CLC Sequence Viewer 7	QIAGEN Aarhus A/S
Excel	Microsoft
FitMaster	Heka
IGOR	WaveMetrics, Inc.
Texmaker (LaTeX)	Pascal Brachet, Joël Amblard
PatchMaster	Heka
PowerPoint	Microsoft
Pymol	DeLano Scientific LLC, Schrödinger

**Sequenz-Kennnummern der Uniprot-GenBank**

<b>K<sub>2</sub>P-Kanäle (human)</b>	<b>Sequenz-Kennnummer</b>
TREK1	O95069
TREK2	P57789
TRAAK	Q9NYG8
TALK1	Q96T55
TALK2	Q96T54
TASK2	O95279
TRESK	Q7Z418
TWIK1	O00108
TWIK2	Q9Y257
KCNK7	Q9Y2U2
TASK5	Q9H427
TASK1	O14649
TASK3	Q9NPC2
THIK1	Q9HB14
THIK2	Q9HB15

## 5.2 Wertetabellen

M2 rel. P <sub>O</sub> = pH 8 / pH 5	rel. P <sub>O</sub> % initial	±	n	rel. P <sub>O</sub> % MTSET <sup>+</sup> <sub>pH8</sub>	±	n	rel. P <sub>O</sub> % MTSET <sup>+</sup> <sub>pH5</sub>	±	n
TREK1-WT	4.8	0.7	29						
L180C	1.6	0.6	8						
G181C	9.1	1.2	10						
I182C	7.2	1.1	7						
P183C	3.6	0.9	8						
L184C	19.3	4.1	6						
F185C	15.3	4.0	7						
G186C	14.6	3.9	20	67.9	9.7	10	72.2	6.9	10
F187C	3.8	0.5	21	19.2	2.3	11	4.2	0.8	9
L188C	87.1	7.0	21	106.7	1.5	10	102.1	1.4	11
L189C	47.9	4.5	20	88.5	5.1	10	59.2	4.0	10
A190C	1.6	0.3	20	8.9	2.9	10	4.4	0.8	10
G191C	5.0	1.4	8						
V192C	3.2	1.0	6						
G193C	44.2	7.5	20	70.2	6.1	10	75.7	5.5	9
D194C	9.2	2.5	12						
Q195C	6.9	1.0	7						
L196C	29.1	2.6	20	67.0	5.0	9	24.4	3.6	8
G197C	100.6	2.5	20	102.9	2.1	10	99.3	1.4	10
T198C	54.8	8.3	24	42.2	6.8	10	43.4	14.3	10
I199C	87.8	11.7	11						
F200C	110.3	3.7	11	109.6	1.0	11	112.3	3.6	11
G201C	5.5	1.1	20	32.2	10.5	10	45.3	10.0	10
K202C	5.7	1.6	8						
G203C	11.4	2.6	9						
I204C	12.4	1.9	45	102.6	0.9	14	75.0	4.5	10
A205C	9.3	2.8	20	22.9	4.5	10	22.8	3.5	10
K206C	46.5	6.1	10						
V207C	13.8	1.6	20	3.8	0.7	10	14.3	2.0	9
E208C	70.0	6.1	20	96.8	6.3	9	76.5	8.4	9
D209C	24.0	5.4	10						
T210C	15.6	7.1	7						
F211C	22.2	3.1	20	9.0	2.8	10	22.4	4.7	10
I212C	12.5	3.3	8						
K213C	17.0	4.1	9						
W214C	49.2	9.2	11						
N215C	2.6	0.7	6						

<b>M2</b> <b>A<sub>F</sub> =</b> <b>pH 5 / pH 8</b>	<b>MTSET<sup>+</sup><sub>pH8</sub></b> <b>A<sub>F</sub></b> <b>I<sub>basal</sub></b>	<b>±</b>	<b>MTSET<sup>+</sup><sub>pH8</sub></b> <b>A<sub>F</sub></b> <b>I<sub>max</sub></b>	<b>±</b>	<b>n</b>	<b>MTSET<sup>+</sup><sub>pH5</sub></b> <b>A<sub>F</sub></b> <b>I<sub>basal</sub></b>	<b>±</b>	<b>MTSET<sup>+</sup><sub>pH5</sub></b> <b>A<sub>F</sub></b> <b>I<sub>max</sub></b>	<b>±</b>	<b>n</b>
<b>TREK1-WT</b>	1.08	0.12	0.98	0.02	12	1.66	0.39	1.00	0.01	11
<b>L180C</b>	<b>1.04</b>	0.02	<b>1.02</b>	0.02	4	<b>1.00</b>	0.04	<b>1.05</b>	0.02	4
<b>G181C</b>	<b>1.00</b>	0.08	<b>0.97</b>	0.05	5	<b>1.44</b>	0.48	<b>1.01</b>	0.02	5
<b>I182C</b>	<b>1.13</b>	0.17	<b>0.92</b>	0.04	4	<b>1.53</b>	0.40	<b>1.00</b>	0.00	3
<b>P183C</b>	<b>1.04</b>	0.01	<b>1.00</b>	0.01	3	<b>1.14</b>	0.10	<b>1.00</b>	0.01	5
<b>L184C</b>	<b>0.96</b>	0.06	<b>0.97</b>	0.02	3	<b>1.15</b>	0.09	<b>0.98</b>	0.01	3
<b>F185C</b>	<b>1.00</b>	0.02	<b>1.00</b>	0.00	4	<b>1.06</b>	0.08	<b>0.97</b>	0.01	3
<b>G186C</b>	<b>9.53</b>	2.29	<b>1.91</b>	0.28	10	<b>50.54</b>	13.63	<b>3.56</b>	0.53	10
<b>F187C</b>	<b>8.25</b>	1.45	<b>1.31</b>	0.14	11	<b>1.12</b>	0.06	<b>1.02</b>	0.01	10
<b>L188C</b>	<b>1.63</b>	0.06	<b>1.58</b>	0.11	10	<b>2.64</b>	0.55	<b>1.41</b>	0.08	11
<b>L189C</b>	<b>0.76</b>	0.03	<b>0.53</b>	0.02	10	<b>2.15</b>	0.35	<b>1.01</b>	0.01	10
<b>A190C</b>	<b>8.77</b>	0.39	<b>1.95</b>	0.13	10	<b>7.47</b>	0.23	<b>2.05</b>	0.09	10
<b>G191C</b>	<b>1.06</b>	0.03	<b>1.01</b>	0.01	4	<b>1.56</b>	0.41	<b>1.01</b>	0.01	4
<b>V192C</b>	<b>1.09</b>	0.12	<b>0.98</b>	0.08	3	<b>1.04</b>	0.11	<b>1.01</b>	0.00	3
<b>G193C</b>	<b>5.77</b>	1.06	<b>2.02</b>	0.13	10	<b>4.41</b>	1.22	<b>1.83</b>	0.14	10
<b>D194C</b>	<b>1.00</b>	0.05	<b>1.00</b>	0.03	3	<b>1.01</b>	0.05	<b>1.01</b>	0.05	7
<b>Q195C</b>	<b>1.02</b>	0.03	<b>0.99</b>	0.07	4	<b>2.64</b>	1.21	<b>1.01</b>	0.02	3
<b>L196C</b>	<b>2.81</b>	0.21	<b>1.40</b>	0.14	10	<b>1.13</b>	0.06	<b>1.02</b>	0.01	10
<b>G197C</b>	<b>1.24</b>	0.05	<b>1.19</b>	0.02	10	<b>1.25</b>	0.04	<b>1.27</b>	0.05	10
<b>T198C</b>	<b>0.45</b>	0.04	<b>0.74</b>	0.06	13	<b>1.02</b>	0.06	<b>0.99</b>	0.02	11
<b>I199C</b>	<b>1.00</b>	0.01	<b>1.02</b>	0.02	4	<b>1.14</b>	0.13	<b>1.00</b>	0.00	7
<b>F200C</b>	<b>1.23</b>	0.04	<b>1.22</b>	0.02	11	<b>1.01</b>	0.01	<b>1.00</b>	0.00	10
<b>G201C</b>	<b>10.22</b>	1.80	<b>2.28</b>	0.20	10	<b>31.05</b>	6.03	<b>2.63</b>	0.33	10
<b>K202C</b>	<b>0.94</b>	0.09	<b>0.96</b>	0.02	5	<b>3.26</b>	1.48	<b>1.02</b>	0.05	3
<b>G203C</b>	<b>1.12</b>	0.07	<b>0.96</b>	0.01	6	<b>2.26</b>	0.32	<b>1.00</b>	0.01	4
<b>I204C</b>	<b>18.87</b>	5.25	<b>1.16</b>	0.05	11	<b>8.99</b>	2.91	<b>1.08</b>	0.03	10
<b>A205C</b>	<b>4.06</b>	0.68	<b>1.18</b>	0.03	10	<b>4.62</b>	0.72	<b>1.26</b>	0.03	10
<b>K206C</b>	<b>0.99</b>	0.01	<b>0.98</b>	0.01	5	<b>1.20</b>	0.19	<b>0.98</b>	0.01	5
<b>V207C</b>	<b>0.21</b>	0.02	<b>0.84</b>	0.02	10	<b>1.01</b>	0.06	<b>1.00</b>	0.01	10
<b>E208C</b>	<b>1.42</b>	0.12	<b>1.01</b>	0.01	10	<b>1.15</b>	0.05	<b>1.00</b>	0.01	10
<b>D209C</b>	<b>1.02</b>	0.02	<b>0.97</b>	0.01	5	<b>0.98</b>	0.03	<b>0.98</b>	0.01	3
<b>T210C</b>	<b>1.09</b>	0.18	<b>1.05</b>	0.17	4	<b>1.01</b>	0.03	<b>0.99</b>	0.01	3
<b>F211C</b>	<b>0.25</b>	0.04	<b>0.85</b>	0.02	10	<b>1.15</b>	0.07	<b>0.98</b>	0.01	10
<b>I212C</b>	<b>1.04</b>	0.01	<b>0.99</b>	0.01	4	<b>4.79</b>	3.17	<b>0.99</b>	0.00	4
<b>K213C</b>	<b>1.07</b>	0.05	<b>0.98</b>	0.01	5	<b>2.49</b>	0.68	<b>0.99</b>	0.00	4
<b>W214C</b>	<b>0.97</b>	0.01	<b>0.99</b>	0.00	7	<b>1.01</b>	0.04	<b>0.99</b>	0.00	4
<b>N215C</b>	<b>1.04</b>	0.05	<b>1.01</b>	0.01	4	<b>0.97</b>	0.05	<b>1.02</b>	0.00	3

M3 & WT rel. P <sub>O</sub> = pH 8 / pH 5	rel. P <sub>O</sub> % initial	±	n	rel. P <sub>O</sub> % MTSET <sup>+</sup> <sub>pH8</sub>	±	n	rel. P <sub>O</sub> % MTSET <sup>+</sup> <sub>pH5</sub>	±	n
TREK1-WT (8P)	1.2	0.2	13						
TREK1-ΔC100	8.9	0.6	60						
TREK1-WT (3P)	4.8	0.7	29						
V216C	6.0	1.7	7						
S217C	15.4	3.1	8						
Q218C	32.9	3.2	7						
T219C	7.0	1.4	7						
K220C	3.3	0.5	7						
I221C	11.1	1.6	20	60.5	3.8	10	51.8	5.0	10
R222C	93.1	4.9	20	97.2	62.1	10	103.0	5.3	10
I223C	33.0	4.6	21	105.3	1.0	10	75.0	5.7	11
I224C	7.0	1.1	20	99.0	1.8	10	90.0	2.3	10
F229C	6.8	1.0	21	98.5	2.9	10	97.7	1.2	10

M3 A <sub>F</sub> = pH 5 / pH 8	MTSET <sup>+</sup> <sub>pH8</sub> A <sub>F</sub> I <sub>basal</sub>	±	MTSET <sup>+</sup> <sub>pH8</sub> A <sub>F</sub> I <sub>max</sub>	±	n	MTSET <sup>+</sup> <sub>pH5</sub> A <sub>F</sub> I <sub>basal</sub>	±	MTSET <sup>+</sup> <sub>pH5</sub> A <sub>F</sub> I <sub>max</sub>	±	n
TREK1-WT	1.08	0.12	0.98	0.02	12	1.66	0.39	1.00	0.01	11
V216C	1.01	0.08	1.00	0.01	4	1.34	0.07	1.00	0.01	3
S217C	1.02	0.02	1.01	0.02	5	1.01	0.01	0.97	0.00	3
Q218C	1.01	0.02	1.00	0.01	4	1.01	0.04	1.03	0.03	3
T219C	0.91	0.03	0.96	0.01	4	0.90	0.04	1.01	0.03	3
K220C	1.09	0.10	0.97	0.01	4	1.56	0.42	1.03	0.02	3
I221C	6.54	0.98	1.28	0.04	10	12.26	2.95	1.28	0.06	10
R222C	1.50	0.35	1.14	0.05	10	1.14	0.03	1.09	0.02	10
I223C	7.92	4.33	1.11	0.04	10	4.68	1.35	1.00	0.01	10
I224C	35.83	12.76	1.26	0.10	10	31.54	8.03	1.53	0.18	10
F229C	43.46	16.58	2.03	0.36	11	46.87	14.01	1.70	0.25	10

M4 rel. P <sub>O</sub> = pH 8 / pH 5	rel. P <sub>O</sub> % initial	±	n	rel. P <sub>O</sub> % MTSET <sup>+</sup> <sub>pH8</sub>	±	n	rel. P <sub>O</sub> % MTSET <sup>+</sup> <sub>pH5</sub>	±	n
TREK1-WT	4.8	0.7	29						
W290C	96.7	4.1	8						
F291C	13.2	4.8	6						
W292C	2.5	0.3	9						
I293C	60.7	10.8	10						
L294C	16.6	7.9	9						
V295C	4.3	1.3	10						
G296C									
L297C	50.5	3.1	10						
A298C	10.9	8.3	7						
Y299C	20.3	2.8	6						
F300C	12.7	3.7	7						
A301C	41.7	9.3	20	135.0	13.3	10	123.8	18.1	10
A302C	121.9	4.4	20	113.4	1.2	10	104.3	1.6	10
V303C	6.0	2.0	10						
L304C	7.8	1.3	26	27.0	4.6	12	16.2	4.9	13
S305C	19.9	4.6	19	28.8	5.2	9	32.1	4.9	9
M306C	46.2	5.6	22	70.3	7.8	12	35.8	5.3	10
I307C	9.1	1.7	28	18.2	2.5	17	10.1	3.0	11
G308C	3.0	0.5	16	6.1	3.0	10	4.1	0.7	6
D309C	8.8	2.1	20	10.0	2.8	10	5.0	1.6	10
W310C	48.2	4.3	23	26.7	3.9	13	45.5	10.2	10
L311C	9.8	1.9	21	11.8	2.7	11	8.5	2.1	10
R312C	26.0	7.0	6						
V313C	11.0	2.6	20	10.4	3.7	10	8.8	3.7	9
I314C	3.7	0.5	20	6.4	1.3	10	19.2	2.8	10
S315C	4.0	0.6	27	2.3	0.4	11	7.2	1.4	16
K316C	25.9	4.0	6						
K317C	9.0	2.3	9						
T318C	24.7	4.8	25	17.0	2.9	11	51.1	8.7	7
K319C	3.6	1.0	6						
E320C	12.6	2.7	6						
E321C	104.3	7.4	6						
V322C	6.9	1.2	19	8.0	2.9	8	10.3	2.7	11
G323C	19.2	6.5	7						
E324C	26.5	8.7	6						
F325C	3.0	0.6	21	4.6	0.8	10	4.7	0.9	11

<b>M4</b> <b>A<sub>F</sub> =</b> <b>pH 5 / pH 8</b>	<b>MTSET<sup>+</sup><sub>pH8</sub></b> <b>A<sub>F</sub></b> <b>I<sub>basal</sub></b>	<b>±</b>	<b>MTSET<sup>+</sup><sub>pH8</sub></b> <b>A<sub>F</sub></b> <b>I<sub>max</sub></b>	<b>±</b>	<b>n</b>	<b>MTSET<sup>+</sup><sub>pH5</sub></b> <b>A<sub>F</sub></b> <b>I<sub>basal</sub></b>	<b>±</b>	<b>MTSET<sup>+</sup><sub>pH5</sub></b> <b>A<sub>F</sub></b> <b>I<sub>max</sub></b>	<b>±</b>	<b>n</b>
<b>TREK1-WT</b>	1.08	0.12	0.98	0.02	12	1.66	0.39	1.00	0.01	11
<b>W290C</b>	<b>0.98</b>	0.03	<b>0.99</b>	0.01	3	<b>1.05</b>	0.01	<b>0.99</b>	0.01	5
<b>F291C</b>	<b>1.03</b>	0.03	<b>1.02</b>	0.03	3	<b>0.98</b>	0.03	<b>1.00</b>	0.01	3
<b>W292C</b>	<b>1.02</b>	0.01	<b>1.01</b>	0.03	5	<b>1.04</b>	0.05	<b>1.00</b>	0.03	5
<b>I293C</b>	<b>1.05</b>	0.05	<b>0.98</b>	0.01	7	<b>1.40</b>	0.28	<b>1.01</b>	0.01	3
<b>L294C</b>	<b>1.01</b>	0.04	<b>1.00</b>	0.02	6	<b>1.00</b>	0.02	<b>1.01</b>	0.02	3
<b>V295C</b>	<b>1.01</b>	0.02	<b>1.00</b>	0.02	6	<b>1.01</b>	0.04	<b>1.00</b>	0.01	4
<b>G296C</b>	<b>1.08</b>	0.04	<b>1.16</b>	0.08	3	<b>0.95</b>	0.03	<b>1.04</b>	0.02	3
<b>L297C</b>	<b>0.97</b>	0.03	<b>1.01</b>	0.01	7	<b>1.15</b>	0.09	<b>1.02</b>	0.02	3
<b>A298C</b>	<b>1.02</b>	0.02	<b>1.00</b>	0.03	4	<b>0.97</b>	0.02	<b>0.99</b>	0.02	4
<b>Y299C</b>	<b>1.04</b>	0.01	<b>1.02</b>	0.00	6	<b>1.28</b>	0.14	<b>1.00</b>	0.01	3
<b>F300C</b>	<b>1.02</b>	0.06	<b>1.00</b>	0.01	4	<b>1.02</b>	0.02	<b>1.02</b>	0.01	3
<b>A301C</b>	<b>3.00</b>	0.34	<b>0.68</b>	0.06	10	<b>3.43</b>	0.66	<b>0.80</b>	0.04	10
<b>A302C</b>	<b>1.43</b>	0.08	<b>1.62</b>	0.07	10	<b>1.45</b>	0.05	<b>1.58</b>	0.07	10
<b>V303C</b>	<b>1.01</b>	0.02	<b>1.02</b>	0.02	5	<b>1.21</b>	0.19	<b>1.01</b>	0.02	5
<b>L304C</b>	<b>4.81</b>	0.48	<b>1.67</b>	0.16	11	<b>4.76</b>	0.83	<b>1.70</b>	0.10	12
<b>S305C</b>	<b>4.30</b>	0.97	<b>3.93</b>	0.39	9	<b>16.71</b>	3.04	<b>2.28</b>	0.23	10
<b>M306C</b>	<b>1.88</b>	0.22	<b>1.34</b>	0.07	12	<b>1.08</b>	0.05	<b>1.00</b>	0.00	10
<b>I307C</b>	<b>2.11</b>	0.18	<b>0.62</b>	0.04	14	<b>1.01</b>	0.01	<b>0.99</b>	0.01	11
<b>G308C</b>	<b>4.40</b>	0.71	<b>2.42</b>	0.24	10	<b>1.30</b>	0.10	<b>0.98</b>	0.03	6
<b>D309C</b>	<b>0.62</b>	0.06	<b>0.84</b>	0.02	10	<b>0.97</b>	0.19	<b>0.79</b>	0.04	10
<b>W310C</b>	<b>0.31</b>	0.03	<b>0.65</b>	0.06	13	<b>1.12</b>	0.11	<b>1.00</b>	0.01	10
<b>L311C</b>	<b>0.27</b>	0.03	<b>0.21</b>	0.04	12	<b>1.03</b>	0.07	<b>0.99</b>	0.05	11
<b>R312C</b>	<b>0.98</b>	0.03	<b>0.98</b>	0.02	4	<b>1.00</b>	0.08	<b>1.00</b>	0.02	3
<b>V313C</b>	<b>0.34</b>	0.03	<b>0.59</b>	0.04	10	<b>0.67</b>	0.13	<b>0.64</b>	0.05	10
<b>I314C</b>	<b>0.19</b>	0.01	<b>0.12</b>	0.02	10	<b>0.90</b>	0.05	<b>0.16</b>	0.02	10
<b>S315C</b>	<b>0.14</b>	0.03	<b>0.20</b>	0.03	11	<b>0.64</b>	0.19	<b>0.29</b>	0.03	15
<b>K316C</b>	<b>1.04</b>	0.03	<b>0.94</b>	0.00	3	<b>1.00</b>	0.10	<b>1.07</b>	0.09	3
<b>K317C</b>	<b>1.02</b>	0.09	<b>1.00</b>	0.05	4	<b>1.18</b>	0.18	<b>1.03</b>	0.07	5
<b>T318C</b>	<b>0.18</b>	0.04	<b>0.19</b>	0.04	11	<b>2.28</b>	0.70	<b>0.41</b>	0.15	14
<b>K319C</b>	<b>1.09</b>	0.03	<b>1.16</b>	0.06	3	<b>1.22</b>	0.18	<b>0.98</b>	0.02	3
<b>E320C</b>	<b>0.99</b>	0.01	<b>1.00</b>	0.03	3	<b>0.84</b>	0.19	<b>1.03</b>	0.02	3
<b>E321C</b>	<b>1.01</b>	0.04	<b>0.95</b>	0.00	3	<b>1.11</b>	0.05	<b>1.01</b>	0.01	3
<b>V322C</b>	<b>0.36</b>	0.04	<b>0.46</b>	0.10	8	<b>0.62</b>	0.09	<b>0.42</b>	0.04	11
<b>G323C</b>	<b>1.00</b>	0.03	<b>1.00</b>	0.02	3	<b>1.53</b>	0.34	<b>1.05</b>	0.04	4
<b>E324C</b>	<b>1.07</b>	0.07	<b>1.00</b>	0.05	3	<b>1.36</b>	0.22	<b>1.02</b>	0.02	3
<b>F325C</b>	<b>0.50</b>	0.04	<b>0.46</b>	0.06	10	<b>0.78</b>	0.03	<b>0.32</b>	0.05	11

<b>MTSET- modifizierbare Mutanten</b>	<b>t<sub>1/2</sub> pH 8</b>	<b>±</b>	<b>t<sub>1/2</sub> pH 5</b>	<b>±</b>	<b>Faktor</b>
<b>G186C</b>	10.9	1.9	21.9	5.4	2.0
<b>F187C</b>					
<b>L188C</b>	0.6	0.2	14.8	2.2	25.6
<b>L189C</b>	2.4	1.0	18.5	1.5	7.6
<b>A190C</b>	3.7	0.9	4.9	1.0	1.3
<b>G193C</b>	3.7	1.0	57.1	7.9	15.6
<b>L196C</b>					
<b>G197C</b>	0.2	0.0	1.4	0.2	8.0
<b>T198C</b>					
<b>F200C</b>					
<b>G201C</b>	2.0	0.7	20.1	8.0	9.8
<b>I204C</b>	5.4	1.2	19.2	1.2	3.5
<b>A205C</b>	1.4	0.4	7.9	1.6	5.7
<b>V207C</b>					
<b>E208C</b>					
<b>F211C</b>					
<b>I221C</b>	1.8	0.2	1.9	0.2	1.0
<b>R222C</b>	0.2	0.1	2.2	0.5	9.9
<b>I223C</b>	4.9	2.5	26.8	6.4	5.5
<b>I224C</b>	39.1	12.9	112.4	14.5	2.9
<b>F229C</b>	35.3	8.9	62.1	12.5	1.8
<b>A301C</b>	3.8	0.8	5.3	1.3	1.4
<b>A302C</b>	0.6	0.1	24.3	2.6	39.3
<b>L304C</b>	21.6	2.4	42.5	6.5	2.0
<b>S305C</b>	2.7	0.4	9.1	1.3	3.4
<b>M306C</b>					
<b>I307C</b>					
<b>G308C</b>					
<b>D309C</b>	7.6	1.3	8.3	3.8	1.1
<b>W310C</b>					
<b>L311C</b>					
<b>V313C</b>	1.3	0.7	2.5	0.4	1.9
<b>I314C</b>	0.2	0.0	5.1	0.8	29.1
<b>S315C</b>	0.3	0.1	33.7	10.4	99.9
<b>T318C</b>	0.8	0.2	101.1	14.6	134.1
<b>V322C</b>	0.6	0.3	9.4	1.6	16.1
<b>F325C</b>	0.6	0.2	9.3	1.7	14.8



### 5.3 Abkürzungen, Tabellen-, Abbildungs- und Literaturverzeichnis

#### Abkürzungen

2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl borate
A	Ampere
Å	Angström
$A_F$	Aktivierungsfaktor
Ag	Silber
AgCl	Silberchlorid
ATP	Adenosintriphosphat
$BK_{Ca}$	big conductance potassium channel
C	Celsius
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
$Cs^+$	Cäsiumionen
C-Terminus	Carboxy-Terminus
$Ca^{2+}$	Calciumionen
$Ca_V$	voltage-gated calcium channel
DNA	Desoxyribonucleinsäure
$EC_{50}$	Konzentration halbmaximalen Effektes
E. coli	Escherichia coli
ERW	E208-R222-W310
et al.	und weitere
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
$H_K$	Hill-Koeffizient
$H^+$	Wasserstoffionen
I	Stromstärke
$IC_{50}$	Konzentration halbmaximaler Inhibition
$K^+$	Kaliumionen
KCNx	Potassium channel subfamilies
$K_{Ca}$	calcium activated potassium channel
$K_D$	Dissoziationskonstante
$K_{IR}$	Inward Rectifying potassium channel
$K_V$	voltage-gated potassium channel
$K_{2P}$	Two-Pore domain potassium channel
l	Liter
m	Meter
M	molar
M(1-4)	$K_{2P}$ -(Trans-)Membransegmente(1-4)
MA	Membranabstoßung
MI	Membraninteraktion
$Mg^{2+}$	Magnesiumionen
MTS	Methanethiosulfonat
$Na^+$	Natriumionen
$Na_V$	voltage-gated sodium channel
$NH_4^+$	Ammoniumionen
NMDA	N-methyl-D-aspartat
N-Terminus	Amino Terminus
P1/P2	$K_{2P}$ -Porendomänen

PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Porendomäne
PDB-ID	protein data base identification number
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pH <sub>e</sub>	extrazellulärer pH-Wert
pH <sub>i</sub>	intrazellulärer pH-Wert
pH <sub>50</sub>	Protonenkonzentration halbmaximalen Effektes
P <sub>O</sub>	Offenwahrscheinlichkeit
PK	Proteinkinasen
PUFA	polyunsaturated fatty acids
QA <sup>+</sup>	Quartäre Ammoniumionen
R	Widerstand
Rb <sup>+</sup>	Rubidiumionen
R <sub>F</sub>	Ratenfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
s	Sekunden
S	Siemens
S0-S6	K <sub>V</sub> -Transmembransegmente
SCAM	Substitued-cysteine-accessibility-method
SF	Selektivitätsfilter
SK <sub>Ca</sub>	small conductance potassium channel
t <sub>1/2</sub>	Zeit nach halb-abgeschlossener Modifikation
TM(1-4)	Transmembranhelix (1-4)
TMD	Transmembrandomäne
TALK	TWIK-related alkaline-sensitive K <sup>+</sup> channel
TASK	TWIK-related acid-sensitive K <sup>+</sup> channel
THIK	Tandem pore domain halotane-inhibited K <sup>+</sup> channel
TRAAK	TWIK-related arachidonic acid-stimulated K <sup>+</sup> channel
TREK	TWIK-related K <sup>+</sup> channel
TRESK	TWIK-related spinal cord K <sup>+</sup> channel
TWIK	Two-pore domain weakly inward rectifier K <sup>+</sup> -channel
U	Spannung
V	Volt
WT	Wild Typ
Δμ	elektrochemische Triebkraft
Ω	Ohm

### Tabellenverzeichnis

- 1 Relative Offenwahrscheinlichkeiten und Modifikationsgeschwindigkeiten unter Verwendung verschiedener MTS-Reagenzien (Abbildung 27)
- 2 Auswertung der pH<sub>i</sub>-Zustandsabhängigkeit des M2-Segmentes (Abbildung 28).
- 3 Auswertung der pH<sub>i</sub>-Zustandsabhängigkeit der M3- und M4-Segmente (Abbildung 29).

**Abbildungsverzeichnis**

- 1 Einteilung mammaler Kaliumkanäle anhand der Anzahl ihrer Transmembrandomänen.
- 2 Dendrogramm der Kaliumkanäle und schematische Struktur einer  $K_{2P}$ -Untereinheit.
- 3  $K_{2P}$ -Kanal-Dendrogramm der 15 humanen Gene mit Einteilung der Kanäle in sechs Subfamilien.
- 4 Dimerbildung zweier  $K_{2P}$ -Untereinheiten und Kristallstruktur eines  $K_{2P}$ -Kanals.
- 5 Schema der polymodalen Regulation am Beispiel des TREK1-Kanals.
- 6 Identifizierung des sensorischen TREK1-E321<sup>-</sup> zur Transduktion C-terminaler Signale.
- 7 Prinzip und Rahmenbedingung der Patch-Clamp-Experimente an der *Xenopus Oozyte*.
- 8 Ermittlung des EC<sub>50</sub> und des Hill-Koeffizienten ( $H_K$ ) am Beispiel der NFX-Inhibition.
- 9 Auswertung der 3-Punkte-Bestimmungen zur Charakterisierung der 82 Punktmutationen des TREK1-Kanals.
- 10 Die irreversible MTSET<sup>+</sup>-Modifikation an Cystein-Seitenketten des TREK-Kanals.
- 11 Technischer Aufbau der Patch-Clamp-Experimente.
- 12 Die intrazelluläre pH-Aktivierung von TREK1-, TREK2- und TRAAK-Kanälen.
- 13 Messprotokoll zur Analyse von Cystein-Einzelmutationen der Porensegmente des TREK1-Kanals.
- 14 Die Steigerung der Grundaktivität des TREK1-Kanals durch Cystein-Substitution.
- 15 pH<sub>i</sub>-Aktivierung nach Trunkierung des distalen C-Terminus und proximalen Mutationen.
- 16 Die Verteilung aller geladenen Seitenketten innerhalb des TREK1-Kanals.
- 17 Die pH<sub>i</sub>-sensorischen Bereiche des TREK1-Kanals.
- 18 Substitution nach Cystein enthüllte eine kritische und TREK/TRAAK spezifische Aminosäuretriade.
- 19 Lage und Interaktionsabstände der ERW-Domänentriade in Frontal- und Rückansicht.
- 20 Das kritische Bündel um TREK1-F200 zeigte Verlust der Gatingfunktion nach Cystein-Austausch.
- 21 Kritische Cystein-Mutationen im Umfeld des Selektivitätsfilters des TREK1-Kanals.
- 22 Seitliche Membran-Fenestrierung des gesenkten Kanal-Zustandes fungiert als NFX-Bindungstasche.
- 23 MTSET<sup>+</sup>-Applikation auf den TREK1-WT-Kanal induzierte keine Veränderung der Stromantwort.
- 24 Eliminierung falsch positiver Ergebnisse ohne klaren Modifikationsverlauf.
- 25 Modulation der Ströme von TREK1-S305C und -L311C über MTSET<sup>+</sup>-Modifikation.
- 26 MTSET<sup>+</sup>-Effekte der modifizierten Seitenketten im Strukturmodell.
- 27 Lysin-Mutation und Cystein-Modifikationen an TREK1-I204C destabilisieren die ERW-Interaktion.
- 28 Auswertung der pH<sub>i</sub>-Zustandsabhängigkeit des M2-Segmentes.
- 29 Auswertung der pH<sub>i</sub>-Zustandsabhängigkeit der M3- und M4-Segmente.
- 30 Die pH<sub>i</sub>-zustandsabhängigen Cystein-Seitenketten im Strukturmodell.
- 31 Relative Offenwahrscheinlichkeiten nach MTSET<sup>+</sup>-Modifikation bei pH<sub>i</sub> 8.
- 32 Nach MTSET<sup>+</sup>-Modifikation destabilisierte Cystein-Mutationen im Strukturmodell.
- 33 MTS-Modifikation von TREK1-L189C zeigt Einfluss auf den Selektivitätsfilter.
- 34 Lokalisation und MTS-Effekte der modifizierten Cystein-Seitenketten im Strukturmodell.
- 35 Gering und nicht pH<sub>i</sub>-abhängige Seitenketten der Porensegmente M2, M3 und M4.
- 36 Schema der MTSET<sup>+</sup>-Effekte auf die Porenhelices einer TREK1-Untereinheit.
- 37 Darstellung der MTSET<sup>+</sup>-Effekte in den Strukturmodellen des TREK2-Kanals.
- 38 Sequenz- und pH<sub>i</sub>-Zustandsvergleich bei intrazellulärer Aktivierung der TREK/TRAAK-Subfamilie.
- 39 Sequenzvergleich der Aminosäuren-Sequenzen aller 15 humanen  $K_{2P}$ -Kanäle.

**Literatur**

- Aggarwal, S. K., ; MacKinnon, R., **1996**, *Contribution of the S4 Segment to Gating Charge in the Shaker K<sup>+</sup> Channel*, Neuron 16: 1169-1177.
- Akabas, M. H. Stauffer, D. D.; Xu, M.; Karlin, A., **1992**, *Acetylcholine Receptor Channel Structure Probed in Cysteine-Substitution Mutants*, Science 258(5080): 307-310.
- Atkins, P. W., **1996**, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Bagriantsev, S. N.; Clark, K. A.; Minor, D. L., Jr., **2012**, *Metabolic and thermal stimuli control K(2P)2.1 (TREK-1) through modular sensory and gating domains*, EMBO J 31(15): 3297-3308.
- Bagriantsev, S. N.; Peyronnet, R.; Clark, K. A.; Honoré, E.; Minor, D. L., Jr., **2011**, *Multiple modalities converge on a common gate to control K2P channel function*, EMBO J 30(17): 3594-3606.
- Bang, H.; Kim, Y.; Kim, D., **2000**, *TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K<sup>+</sup> channel family.*, J Biol Chem 275(23): 17412-17419.
- Bargmann, C. I., **1998**, *Neurobiology of the Caenorhabditis elegans Genome.*, Science 282: 2028-2033.
- Barros, F.; Dominguez, P.; de la Pena, P., **2012**, *Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating*, Front Pharmacol 3: 49.
- Batulan, Z.; Haddad, G. A.; Blunck, R., **2010**, *An intersubunit interaction between S4-S5 linker and S6 is responsible for the slow off-gating component in Shaker K<sup>+</sup> channels*, J Biol Chem 285(18): 14005-14019.
- Baukrowitz, T.; Tucker, S. J.; Uwe Schulte, U.; Benndorf, K.; Ruppertsberg, J.P.; Fakler, B., **1999**, *Inward rectification in KATP Channels: a pH switch in the pore*, EMBO J 18(4): 847-853.
- Baukrowitz, T.; Yellen, G., **1995**, *Modulation of K<sup>+</sup> Current by Frequency and External [K<sup>+</sup>]: A Tale of Two Inactivation Mechanisms*, Neuron 15: 951-960.
- Beltrán, L.; Beltrán, M.; Aguado, A.; Gisselmann, G.; Hatt, H., **2013**, *2-Aminoethoxydiphenyl borate activates the mechanically gated human KCNK channels KCNK 2 (TREK-1), KCNK 4 (TRAAK), and KCNK 10 (TREK-2)*, Front Pharmacol 4: 63.
- Bichet, D.; Blin, S.; Feliciangeli, S.; Chatelain, F.C.; Bobak, N.; Lesage, F., **2015**, *Silent but not dumb: how cellular trafficking and pore gating modulate expression of TWIK1 and THIK2*, Eur J Physiol 467: 1121-1131.
- Bista, P.; Meuth, S. G.; Kanyshkova, T.; Cerina, M.; Pawlowski, M.; Ehling, P.; Landgraf, P.; Borsotto, M.; Heurteaux, C.; Pape, H. C.; Baukrowitz, T.; Budde, T., **2012**, *Identification of the muscarinic pathway underlying cessation of sleep-related burst activity in rat thalamocortical relay neurons*, Pflugers Arch 463(1): 89-102.
- Blatz, A. L.; Magleby, K. L.; **1986**, *Single apamin blocked Ca-activated K<sup>+</sup> channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle*, Nature 323: 718-720.

- Bockenhauer, D., **2001**, *Ion channels in disease.*, Curr Opin Pediatr 13: 142-149.
- Bockenhauer, D.; Zilberberg, N.; Goldstein, S. A. N., **2001**, *KCNK2: reversible conversion of a hippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel*, nature neuroscience 4(5): 486-491.
- Bollepalli, M. K.; Fowler, P. W.; Rapedius, M.; Shang, L.; Sansom, M. S.; Tucker, S. J.; Baukrowitz, T., **2014**, *State-dependent network connectivity determines gating in a K<sup>+</sup> channel*, Structure 22(7): 1037-1046.
- Brohawn, S. G.; Campbell, E. B.; MacKinnon, R., **2014b**, *Physical mechanism for gating and mechano-sensitivity of the human TRAAK K<sup>+</sup> channel.*, Nature 516(7529): 126-130.
- Brohawn, S. G.; Campbell, E. B.; MacKinnon R., **2013**, *Domain-swapped chain connectivity and gated membrane access in a Fab-mediated crystal of the human TRAAK K<sup>+</sup> channel*, PNAS 110(6): 2129-2134.
- Brohawn, S. G.; del Mármol, J.; MacKinnon, R., **2012**, *Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K<sup>+</sup> ion channel*, Science 335(6067): 436-441.
- Busa, W. B., **1986**, *Mechanisms and consequences of pH-mediated cell regulation*, Ann. Rev. Physiol. 48: 389-402.
- Busa, W. B.; Nuccitelli, R., **1984**, *Metabolic regulation via intracellular pH*, Am J Physiol. 246: 409-438.
- Bustos, D.; Bedoya, M.; Ramirez, D.; Concha, G.; Zuniga, L.; Decher, N.; Hernandez-Rodriguez, E. W.; Sepulveda, F. V.; Martinez, L.; Gonzalez, W., **2020** *Elucidating the Structural Basis of the Intracellular pH Sensing Mechanism of TASK-2 K2P Channels*. Int J Mol Sci 21(2).
- Chavez, R. A.; Gray, A. T.; Zhao, B. B.; Kindler, C. H.; Mazurek, M. J.; Mehta, Y.; Forsayeth, J. R.; Yost, C. S., **1999**, *TWIK-2, a New Weak Inward Rectifying Member of the Tandem Pore Domain Potassium Channel Family*, J Biol Chem 274(12): 7887-7892.
- Chemin, J.; Patel, A. J.; Duprat, F.; Zanzouri, M.; Lazdunski, M.; Honoré, E., **2005b**, *Lysophosphatidic acid-operated K<sup>+</sup> channels*, J Biol Chem 280(6): 4415-4421.
- Chemin, J.; Patel, A. J.; Duprat, F.; Sachs, F.; Lazdunski, M.; Honoré, E., **2007**, *Up- and down-regulation of the mechano-gated K(2P) channel TREK-1 by PIP (2) and other membrane phospholipids*, Pflugers Arch 455(1): 97-103.
- Chemin, J.; Patel, A. J.; Duprat, F.; Lauritzen, I.; Lazdunski, M.; Honoré, E., **2005a**, *A phospholipid sensor controls mechanogating of the K<sup>+</sup> channel TREK-1*, EMBO J 24: 44-53.
- Chen, X.; Bezprozvanny, I.; Tsien, R. W., **1996**, *Molecular Basis of Proton Block of L-Type Ca<sup>2+</sup> channels*, J. Gen. Physiol. 108: 363-374.
- Chesler, M., Kraig, R. P., **1989**, *Intracellular pH Transients of Mammalian Astrocytes*, J. Neurosci. 9(6): 2011-2019.
- Chesler, M.; Kaila, K., **1992**, *Modulation of pH by neuronal activity*, TINS 15(10): 396-402.

- Chowdhury, S.; Haehnel, B. M.; Chanda, B., **2014**, *Interfacial gating triad is crucial for electromechanical transduction in voltage-activated potassium channels*, J Gen Physiol 144(5): 457-467.
- Cohen, A.; Ben-Abu, Y.; Hen, S.; Zilberberg, N., **2008**, *A novel mechanism for human K2P2.1 channel gating. Facilitation of C-type gating by protonation of extracellular histidine residues*, J Biol Chem 283(28): 19448-19455.
- Colman, A.; Bhamra, S.; Valle, G., **1984**, *Post-translational modification of exogenous proteins in Xenopus laevis oocytes*, BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS 12: 932-937.
- Decher, N.; Kiper, A. K.; Rinne, S., **2017**, *Stretch-activated potassium currents in the heart: Focus on TREK-1 and arrhythmias*, Prog Biophys Mol Biol 130(Pt B): 223-232.
- del Camino, D.; Yellen, G., **2001**, *Tight Steric Closure at the Intracellular Activation Gate of a Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel*, Neuron 32: 649-656.
- 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.; Carpenter, E.P., **2015**, *K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac*, Science 347(6227): 1256-1259.
- Doyle, D. A.; Cabral, J. M.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R., **1998**, *The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity*, Science 280: 69-77.
- Dumont, J. N., **1972**, *Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin)*, J. Morphol. 136: 153-180.
- Dumont, J. N.; Brummet, A. R., **1978**, *Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues*, J. Morphol. 155(1): 73-97.
- Duprat, F.; Lesage, F.; Fink, M.; Reyes, R.; Heurteaux, C.; Lazdunski, M., **1997**, *TASK, a human background K<sup>+</sup> channel to sense external pH variations near physiological pH*, EMBO J 16(17): 5464-5471.
- Barish, M. E., **1983**, *A transient calcium-dependent chloride current in the immature Xenopus Oocyte*, J. Physiol. 342: 309-325.
- Endres, W.; Ballanyi, K.; Serve, G.; Grafe, P., **1986**, *Excitatory amino acids and intracellular pH in motoneurons of the isolated frog spinal cord*, Neuroscience Letters 72: 54-58.
- Enyedi, P.; Czirjak, G., **2010**, *Molecular background of leak K<sup>+</sup> currents: two-pore domain potassium channels*, Physiol Rev 90(2): 559-605.
- Fakler, B.; Brändle, U.; Bond, Ch.; Glowatzki, E.; König, C.; Adelman, J.P.; Zenner, H.-P.; Ruppersberg, J.P., **1994**, *A structural determinant of differential sensitivity of cloned inward rectifier K<sup>+</sup> channels to intracellular spermine*, FEBS Letters 356: 199-203.

- Fakler, B.; Brändle, U.; Glowatzki, E.; Weidemann, S.; Zenner, H.-P.; Ruppersberg, J. P., **1995**, *Strong Voltage-Dependent Inward Rectification of Inward Rectifier K<sup>+</sup> Channels Is Caused by Intracellular Spermine*, Cell 80: 149-154.
- Feliciangeli, S.; Chatelain, F. C.; Bichet, D.; Lesage, F., **2015**, *The family of K2P channels: salient structural and functional properties*, J Physiol 593(12): 2587-2603.
- Fink, M.; Duprat, F.; Lesage, F.; Reyes, R.; Romey, G.; Heurteaux, C.; Lazdunski, M., **1996**, *Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K<sup>+</sup> channel*, EMBO J 15(24): 6854-6862.
- Fink, M.; Lesage, F.; Duprat, F.; Heurteaux, C.; Reyes, R.; Fosset, M.; Lazdunski, M., **1998**, *A neuronal two P domain K<sup>+</sup> channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids*, EMBO J 17(12): 3297-3308.
- Flynn, G. E.; Zagotta, W. N., **2001**, *Conformational Changes in S6 Coupled to the Opening of Cyclic Nucleotide-Gated Channels*, Neuron 30: 689-698.
- Goldstein, S. A. N.; Price, L. A.; Rosenthal, D. N.; Pausch, M. H., **1996**, *ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from Drosophila melanogaster by expression in Saccharomyces cerevisiae*, Proc Natl Acad Sci U S A 93: 13256-13261.
- Gonzalez, C.; Baez-Nieto, D.; Valencia, I.; Oyarzun, I.; Rojas, P.; Naranjo, D.; Latorre, R., **2012**, *K(+) channels: function-structural overview*, Compr Physiol 2(3): 2087-2149.
- Gurdon, J. B.; Lane, C. D.; Woodland, H. R.; Marbaix, G., **1971**, *Use of Frog Eggs and Oocytes for the Study of Messenger RNA and its Translation in Living Cells*, Nature 233: 177-182.
- Heginbotham, L.; Zhe Lu, Z.; Abramson, T.; MacKinnon, R., **1994**, *Mutations in the K<sup>+</sup> Channel Signature Sequence*, Biophysical Journal 66: 1061-1067.
- Heginbotham, L.; Abramson, T.; MacKinnon, R., **1992**, *A Functional Connection Between the Pores of Distantly Related Ion Channels as Revealed by Mutant K<sup>+</sup> Channels*, Science 258(5085): 1152-1155.
- Hervieu, G. J.; Cluderay, J. E.; Gray, C. W.; Green, P. J.; Ransom, J. L.; Randall, A. D.; Meadows, H. J., **2001**, *Distribution and Expression of TREK-1, a two-por-domain potassium channel, in the adult rat CNS*, Neuroscience 103(4): 899-919.
- Hibino, H.; Inanobe, A.; Furutani, K.; Murakami, S.; Findlay, I.; Kurachi, Y., **2010**, *Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles*, Physiol Rev 90(1): 291-366.
- Hille, B., **1992**, *Ion channels of excitable membranes*, Sinauer Associates, Inc. 2nd edition.
- Hirano, M.; Onishi, Y.; Yanagida, T.; Ide, T., **2011**, *Role of the KcsA channel cytoplasmic domain in pH-dependent gating*, Biophys J 101(9): 2157-2162.
- Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F.; Katz, K., **1952**, *Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of loligo*, J. Physiol. 116: 424-448.

- Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F., **1952a**, *Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo*, J. Physiol. 116: 449-472.
- Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F., **1952b**, *The components of membrane conductance in the giant axon of loligo*, J. Physiol. 116(473-496).
- Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F., **1952c**, *The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of loligo*, J. Physiol. 116(116): 497-506.
- Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F., **1952d**, *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*, J. Physiol. 117: 500-544.
- Honoré, E., **2007**, *The neuronal background K2P channels: focus on TREK1*, Nat Rev Neurosci 8(4): 251-261.
- Honoré, E.; Maingret, F.; Lazdunski, M.; Patel, A. J., **2002**, *An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K<sup>+</sup> channel TREK-1*, EMBO J 21(12): 2968-2976.
- Hugnot, J.-P.; Salinas, M.; Lesage, F.; Guillemare, E.; de Weille, J.; Heurteaux, C.; Mattei, M.-G.; Lazdunski, M., **1996**, *Kv8.1, a new neuronal potassium channel subunit with specific inhibitory properties towards Shab and Shaw channels*, EMBO J 15(13): 3322-3331.
- Hutchison, C. A. 3rd; Phillips, S.; Edgell, M. H.; Gillam, S.; Jahnke, P.; Smith, M., **1978**, *Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence* J Biol Chem 253(18): 6551-6560.
- Jiang, Y.; Lee, A.; Chen, J.; Cadene, M.; Chait, B. T.; MacKinnon, R., **2002**, *The open pore conformation of potassium channels*, Nature 417: 523-526.
- Kang, D.; Kim, D., **2004**, *Single-channel properties and pH sensitivity of two-pore domain K<sup>+</sup> channels of the TALK family*, Biochem Biophys Res Commun 315(4): 836-844.
- Karlin, A.; Akabas, M. H., **1998**, *Substituted-cysteine-accessibility method*, Methods in Enzymology 293: 123-136.
- Kenyon, G. L.; Bruice, T. W., **1977**, *Novel sulfhydryl reagents*, Meth. Enzymol. 47(407-430).
- Ketchum, K. A.; Joiner, W. J.; Sellers, A. J.; Kaczmarek, L. K.; Goldstein, S. A. N., **1995**, *A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem*, Nature 376: 690-695.
- Khan, A.; Kyle, J. W.; Hanck, D. A.; Lipkind, G. M.; Fozzard, H. A., **2006**, *Isoform-dependent interaction of voltage-gated sodium channels with protons*, J Physiol 576(Pt 2): 493-501.
- Kim, J. B., **2014**, *Channelopathies*, Korean J Pediatr 57(1): 1-18.
- Kim, Y.; Bang, H.; Gnatenco, C.; Kim, D., **2001a**, *Synergistic interaction and the role of C-terminus in the activation of TRAAK K<sup>+</sup> channels by pressure, free fatty acids and alkali*, Pflugers Arch 442(1): 64-72.



- Kim, Y.; Gnatenco, C.; Bang, H.; Kim, D., **2001b**, *Localization of TREK-2 K<sup>+</sup> channel domains that regulate channel kinetics and sensitivity to pressure, fatty acids and pH*, Pflügers Archiv European Journal of Physiology 442(6): 952-960.
- Kim, Y.; Bang, H.; Kim, D., **2000**, *TASK-3, a New Member of the Tandem Pore K<sup>+</sup> Channel Family*, J Biol Chem 275(13): 9340-9347.
- Koh, S. D.; Monaghan, K.; Sergeant, G. P.; Ro, S.; Walker, R. L.; Sanders, K. M.; Horowitz, B., **2001**, *TREK-1 regulation by nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. An essential role in smooth muscle inhibitory neurotransmission*, J Biol Chem 276(47): 44338-44346.
- Latorre, R.; Vergara, C.; Hidalgo, C., **1982**, *Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle*, Proc Natl Acad Sci USA 79: 805-809.
- Lesage, F.; Barhanin, J., **2011**, *Molecular physiology of pH-sensitive background K(2P) channels*, Physiology (Bethesda) 26(6): 424-437.
- Lesage, F.; Guillemare, E.; Fink, M.; Duprat, F.; Lazdunski, M.; Romey, G.; Barhanin, J., **1996a**, *TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure*, EMBO J 15(5): 1004-1011.
- Lesage, F.; Lazdunski, M., **2000**, *Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels*, Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 279(5): F783-F801.
- Lesage, F.; Mattéi, M.-G.; Fink, M.; Barhanin, J.; Lazdunski, M., **1996b**, *Assignment of the Human Weak Inward Rectifier K Channel TWIK-1 Gene to Chromosome 1q42?43*, GENOMICS 34: 153-155.
- Lesage, F.; Reyes, R.; Fink, M.; Duprat, F.; Guillemare, E.; Lazdunski, M., **1996c**, *Dimerization of TWIK-1 K<sup>+</sup> channel subunits via a disulfidebridge*, EMBO J 15(23): 6400-6407.
- Li, B.; Rietmeijer, R.A.; Brohawn, S.G., **2020**, *Structural basis for pH gating of the two-pore domain K<sup>+</sup> channel TASK2*, Nature 586: 457-462.
- Li, Y.; Xu, J.; Xu, Y.; Zhao, X.-Y.; Liu, Y.; Wang, J.; Wang, G.-M.; Lv, Y.-T.; Tang, Q.-Y.; Zhang, Z., **2018**, *Regulatory Effect of General Anesthetics on Activity of Potassium Channels*, Neuroscience Bulletin 34(5): 887-900.
- Liu, Y.; Holmgren, M.; Jurman, M. E.; Yellen, G., **1997**, *Gated Access to the Pore of a Voltage-Dependent K<sup>+</sup> Channel*, Neuron 19: 175-184.
- Lolicato, M.; Arrigoni, C.; Mori, T.; Sekioka, Y.; Bryant, C.; Clark, K. A.; Minor, D. L., Jr., **2017**, *K2P2.1 (TREK-1)-activator complexes reveal a cryptic selectivity filter binding site*, Nature 547(7663): 364-368.
- Lolicato, M.; Riegelhaupt, P. M.; Arrigoni, C.; Clark, K. A.; Minor, D. L., Jr., **2014**, *Transmembrane helix straightening and buckling underlies activation of mechanosensitive and thermosensitive K(2P) channels*, Neuron 84(6): 1198-1212.

- Lopatin, A. N.; Makhina, E. N.; Nichols, C. G., **1994**, *Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification*, Nature 372: 366-369.
- MacKenzie, G.; Franks, N. P.; Brickley, S. G., **2015**, *Two-pore domain potassium channels enable action potential generation in the absence of voltage-gated potassium channels*, Eur J Physiol 467: 989-999.
- Magidovich, E.; Yifrach, O., **2004**, *Conserved Gating Hinge in Ligand- and Voltage-Dependent K<sup>+</sup> Channels*, Biochemistry 43: 13242-13247.
- Maingret, F.; Lauritzen, I.; Patel, A. J.; Heurteaux, C.; Reyes, R.; Lesage, F.; Lazdunski, M.; Honoré, E., **2000a**, *TREK-1 is a heat-activated background K<sup>+</sup> channel*, EMBO J 19(11): 2483-2491.
- Maingret, F.; Patel, A. J.; Lesage, F.; Lazdunski, M.; Honoré, E., **1999b**, *Mechano- or Acid Stimulation, Two Interactive Modes of Activation of the TREK-1 Potassium Channel*, J Biol Chem 274(38): 26691-26696.
- Maingret, F.; Patel, A. J.; Lesage, F.; Lazdunski, M.; Honoré, E., **2000b**, *Lysophospholipids Open the Two-pore Domain Mechano-gated K<sup>+</sup> Channels TREK-1 and TRAAK*, J Biol Chem 275(14): 10128-10133.
- Marty, A., **1981**, *Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes*, Nature 291(5815): 497-500.
- Mathie, A.; Al-Moubarak, E.; Veale, E. L., **2010**, *Gating of two pore domain potassium channels*, J Physiol 588(Pt 17): 3149-3156.
- McClenaghan, C.; Schewe, M.; Aryal, P.; Carpenter, E. P.; Baukrowitz, T.; Tucker, S. J., **2016**, *Polymodal activation of the TREK-2 K2P channel produces structurally distinct open states*, J Gen Physiol 147 (6): 497-505.
- McCoy, J. G.; Nimigean, C. M., **2011**, *Structural correlates of selectivity and inactivation in potassium channels*, Biochim Biophys Acta 1818(2): 272-285.v
- Medhurst, A. D.; Rennie, G.; Chapman, C. G.; Meadows, H.; Duckworth, M. D.; Kelsell, R. E.; Gloger, I. I.; Pangalos, M. N., **2001**, *Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery*, Molecular Brain Research 86(1-2): 101-114.
- Miller, A. N.; Long, S. B., **2012**, *Crystal Structure of the Human Two-Pore Domain Potassium Channel K2P1*, Science 335: 432-436.
- Murbartian, J.; Lei, Q.; Sando, J. J.; Bayliss, D. A., **2005**, *Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels*, J Biol Chem 280(34): 30175-30184.
- Neher, E.; Sakman, B., **1976**, *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres*, Nature 260(5554): 799-802.
- Niemeyer, M. I.; Cid, L. P.; Pena-Munzenmayer, G.; Sepulveda, F. V., **2010**, *Separate gating mechanisms mediate the regulation of K2P potassium channel TASK-2 by intra- and extracellular pH*, J Biol Chem 285(22): 16467-16475.

- Nilius, B.; Honore, E., **2012**, *Sensing pressure with ion channels* Trends Neurosci 35 (8):477-486.
- Ohara, A.; Saeki, Y.; Nishikawa, M.; Yamamoto, Y.; Yamamoto, G., **2006**, *Single-channel Recordings of TREK-1 K<sup>+</sup> Channels in Periodontal Ligament Fibroblasts*, J Dent Res 85(7): 664-669.
- Ottschytch, N.; Raes, A.; Van Hoorick, D.; Snyders, D. J., **2002**, *Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel alpha-subunits identified in the human genome*, Proc Natl Acad Sci U S A 99(12): 7986-7991.
- Pallotta, B. S.; Magleby, K. L.; Barrett, J. N., **1981**, *Single channel recordings of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in rat muscle cell culture*, Nature 293: 471-474.
- Park, Y. B., **1994**, *Ion selectivity and gating of small conductance Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels in cultured rat adrenal chromaffin cells*, J. Physiol. 481.3: 555-570.
- Patel, A. J.; Honoré, E.; Maingret, F.; Lesage, F.; Fink, M.; Duprat, F.; Lazdunski, M., **1998**, *A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K<sup>+</sup> channel*, EMBO J 17(15): 4283-4290.
- Patel, A. J.; Honoré, E.; Lesage, F.; Fink, M.; Romey, G.; Lazdunski, M., **1999**, *Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K<sup>+</sup> channels*, nature neuroscience 2(5): 422-426.
- Patel, A. J.; Honoré, E., **2001**, *Anesthetic-sensitive 2P Domain K<sup>+</sup> channels*, Anesthesiology 95(4): 1013-1021.;
- Piechotta, P. L.; Rapedius, M.; Stansfeld, P. J.; Bollepalli, M. K.; Ehrlich, G.; Andres-Enguix, I.; Fritzenschaft, H.; Decher, N.; Sansom, M. S.; Tucker, S. J.; Baukrowitz, T., **2011**, *The pore structure and gating mechanism of K2P channels*, EMBO J 30(17): 3607-3619.
- Pope, L.; Arrigoni, C.; Lou, H.; Bryant, C.; Gallardo-Godoy, A.; Renslo, A. R.; Minor, D. L., **2018**, *Protein and Chemical Determinants of BL-1249 Action and Selectivity for K2P Channels*, ACS Chemical Neuroscience 9(12): 3153-3165.
- Rajan, S.; Wischmeyer, E.; Karschin, C.; Preisig-Müller, R.; Grzeschik, K.-H.; Daut, J.; Karschin, A.; Derst, C., **2001**, *THIK-1 and THIK-2, a Novel Subfamily of Tandem Pore Domain K<sup>+</sup> Channels*, Journal of Biological Chemistry 276(10): 7302-7311.
- Rajan, S.; Wischmeyer, E.; Xin Liu, G.; Preisig-Müller, R.; Daut, J.; Karschin, A.; Derst, C., **2000**, *TASK-3, a Novel Tandem Pore Domain Acid-sensitive K<sup>+</sup> Channel*, Journal of Biological Chemistry 275(22): 16650-16657.
- Reyes, R.; Duprat, F.; Lesage, F.; Fink, M.; Salinas, M.; Farman, N.; Lazdunski, M., **1998**, *Cloning and Expression of a Novel pH-sensitive Two Pore Domain K<sup>+</sup> Channel from Human Kidney*, J Biol Chem 273(47): 30863-30869.
- Riordan, J. R.; Rommens J. M.; Kerem, B.-S.; Alon, N.; Rozmahel, R; Grzelczak, Z.; Zielenski, R.; Lok, S.; Plavsic, N.; Chou, J.-L.; Drumm, M. L.; and M. C. C. Iannuzzi, F. S., Tsui, L.-C., **1989**, *Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA*, Science 245: 1066-1073.

- Salinas, M.; Reyes, R.; Lesage, F.; Fosset, M.; Heurteaux, C.; Romey, G.; Lazdunski, M., **1999**, *Cloning of a New Mouse Two-P Domain Channel Subunit and a Human Homologue with a Unique Pore Structure*, J Biol Chem 274(17): 11751-11760.
- Sandoz, G.; Thümmler, S.; Duprat, F.; Feliciangeli, S.; Vinh, J.; Escoubas, P.; Guy, N.; Lazdunski, M.; Lesage, F., **2006**, *AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K<sup>+</sup> channels into open leak channels*, EMBO J., 25 : 5864-5872.
- Sandoz, G.; Douguet, D.; Chatelain, F.; Lazdunski, M.; Lesage, F., **2009**, *Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue*, Proc Natl Acad Sci U S A 106(34): 14628-14633.
- Sano, Y.; Inamura, K.; Miyake, A.; Mochizuki, S.; Kitada, C.; Yokoi, H.; Nozawa, K.; Okada, H.; Matsushime, H.; Furuichi, K., **2003**, *A novel two-pore domain K<sup>+</sup> channel, TRESK, is localized in the spinal cord*, J Biol Chem 278(30): 27406-27412.
- Sano, Y.; Mochizuki, S.; Miyake, A.; Kitada, C.; Inamura, K.; Yokoi, H.; Katsura Nozawa, K.; Matsushime, H.; Furuichi, K., **2002**, *Molecular cloning and characterization of Kv6.3, a novel modulatory subunit for voltage-gated K<sup>+</sup> channel Kv2.1*, FEBS Letters 512: 230-234.
- Schewe, M.; Nematian-Ardestani, E.; Sun, H.; Musinszki, M.; Cordeiro, S.; Bucci, G.; de Groot, B. L.; Tucker, S. J.; Rapedius, M.; Baukrowitz, T., **2016**, *A Non-canonical Voltage-Sensing Mechanism Controls Gating in K<sub>2</sub>P K(+) Channels*, Cell 164(5): 937-949.
- Schewe, M.; Sun, H.; Mert, U.; Mackenzie, A.; Pike, A. C. W.; Schulz, F.; Constantin, C.; Vowinkel, K. S.; Conrad, L. J.; Kiper, A. K.; Gonzalez, 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.; Baukrowitz, T., **2019**, *A pharmacological master key mechanism that unlocks the selectivity filter gate in K(+) channels*, Science 363 (6429): 875-880.
- Schmidt, C.; Wiedmann, F.; Kallenberger, S. M.; Ratte, A.; Schulte, J. S.; Scholz, B.; Müller, F. U.; Voigt, N.; Zafeiriou, M. P.; Ehrlich, J. R.; Tochtermann, U.; Veres, G.; Ruhparwar, A.; Karck, M.; Katus, H. A.; Thomas, D., **2017**, *Stretch-activated two-pore-domain (K<sub>2</sub>P) potassium channels in the heart: Focus on atrial fibrillation and heart failure*, Prog Biophys Mol Biol 130(Pt B): 233-243.
- Schmidt, C.; Wiedmann, F.; Schweizer, P. A.; Becker, R.; Katus, H. A.; Thomas, D., **2013**, *Class I antiarrhythmic drugs inhibit human cardiac two-pore-domain K(+) (K<sub>2</sub>P) channels*, Eur J Pharmacol 721(1-3): 237-248.
- Sepulveda, F. V.; Pablo Cid, L.; Teulon, J.; Niemeyer, M. I., **2015**, *Molecular aspects of structure, gating, and physiology of pH-sensitive background K<sub>2</sub>P and Kir K<sup>+</sup>-transport channels*, Physiol Rev 95(1): 179-217.
- Starkus, J. G.; Varga, Z.; Schonherr, R.; Heinemann, S. H., **2003**, *Mechanisms of the inhibition of Shaker potassium channels by protons*, Pflugers Arch 447(1): 44-54.

- Steinberg, E. A.; Wafford, K. A.; Brickley, S. G.; Franks, N. P.; Wisden, W., **2015**, *The role of K(2)p channels in anaesthesia and sleep*, Pflugers Arch 467(5): 907-916.
- Talley, E. M.; Solórzano, G.; Lei, Q.; Kim, D.; Bayliss, D.A., **2001**, *CNS Distribution of Members of the Two-Pore-Domain (KCNK) Potassium Channel Family*, J. Neurosci. 21(19): 7491-7505.
- Van Slyke, A. C.; Cheng, Y. M.; Mafi, P.; Allard, C. R.; Hull, C. M.; Shi, Y. P.; Claydon, T. W., **2012**, *Proton block of the pore underlies the inhibition of hERG cardiac K<sup>+</sup> channels during acidosis*, Am J Physiol Cell Physiol 302(12): C1797-1806.
- Vaughan-Jones, R. D.; Spitzer, K. W.; Swietach, P., **2009**, *Intracellular pH regulation in heart*, J Mol Cell Cardiol 46(3): 318-331.
- Viopio, J.; Pasternak, M.; Rydqvist, B.; Kaila, K., **1991**, *Effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid on extracellular pH in the crayfish stretch-receptor neurone*, J. exp. Biol. 156: 349-361.
- Wague, A.; Joseph, T. T.; Woll, K.A.; Bu, W.; Vaidya, K. A.; Bhanu, N. V.; Garcia, B. A.; Nimigean, Crina M.; Eckenhoff, R. G.; Riegelhaupt, P. M., **2020**, *Mechanistic insights into volatile anesthetic modulation of K2P channels*, doi.org/10.7554/eLife.59839, eLife, Vol 9, 1-23.
- Wei, A.; Jegla, T.; Salkoff, L., **1996**, *Eight Potassium Channel Families Revealed by the C. elegans Genome Project*, Neuropharmacology 35(7): 805-829.
- 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.; Lee, C. J., **2012**, *TREK-1 and Best1 channels mediate fast and slow glutamate release in astrocytes upon GPCR activation*, Cell 151(1): 25-40.
- Woo, J.; Jun, Y. K.; Zhang, Y. H.; Nam, J. H.; Shin, D. H.; Kim, S. J., **2018**, *Identification of critical amino acids in the proximal C-terminal of TREK-2 K(+) channel for activation by acidic pH<sub>i</sub> and ATP-dependent inhibition*, Pflugers Arch, 470, Issue 2, 327-337.
- Zhou, Y.; Xia, X.-M.; Lingle, C. J., **2011**, *Cysteine scanning and modification reveal major differences between BK channels and Kv channels in the inner pore region*, PNAS 108(29): 12161-12166.
- Zhuo, R. G.; Liu, X. Y.; Zhang, S. Z.; Wei, X. L.; Zheng, J. Q.; Xu, J. P.; Ma, X. Y., **2015**, *Insights into the stimulatory mechanism of 2-aminoethoxydiphenyl borate on TREK-2 potassium channel*, Neuroscience 300: 85-93.
- Zhuo, R. G.; Peng, P.; Liu, X. Y.; Yan, H. T.; Xu, J. P.; Zheng, J. Q.; Wei, X. L.; Ma, X. Y., **2016**, *Allosteric coupling between proximal C-terminus and selectivity filter is facilitated by the movement of transmembrane segment 4 in TREK-2 channel*, Sci Rep 6: 21248.
- Zhuo, R. G.; Peng, P.; Zheng, J. Q.; Zhang, Y. L.; Wen, L.; Wei, X. L.; Ma, X. Y., **2017**, *The glycine hinge of transmembrane segment 2 modulates the subcellular localization and gating properties in TREK channels*, Biochem Biophys Res Commun 490(3): 1125-1131.

## 5.4 Danksagung und Eidesstattliche Erklärung

### Danksagung

Mein erster und größter Dank geht im Besonderen an meine Mutter Christa Müller, meinen Vater Hannes Minor, sowie an meine gesamte Familie. Ihr habt mir immer Rückhalt und Kraft gegeben und zuweilen viel Geduld bewiesen, ich danke und liebe euch!

An zweiter Stelle danke ich natürlich Professor Thomas Baukrowitz, dafür dass er mir diese Dissertation ermöglicht und mich immer gut beraten und betreut hat. Sowie Prof. Eric Beitz, welcher sich bereit erklärt hat für diese Arbeit als Gutachter zu fungieren.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern des Physiologischen Institutes der Universität Kiel, die Zusammenarbeit mit den Professoren Bleich, Wulff, Kuhtz-Buschbeck und Terlau, sowie deren Arbeitsgruppen, war mir immer eine große Freude.

Zu nennen wäre des Weiteren Prof. Stephen J. Tucker und sein Arbeitskreis der Universität Oxford, auch hier ein Dank für die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank geht natürlich an den Arbeitskreis von Prof. Baukrowitz: Markus Rapedius, Marcus Schewe, Marianne Musinszki, Ehsan Nematian-Ardestani, Elena Riel, Ria Neumann, Michaela Unmack, Sandra Grüssel, Sönke Cordeiro und Hariolf Fritzenschaft. Den drei letztgenannten danke im Besonderen für die Lesung und die gegebenen Anregungen zur Überarbeitung vorangehender Versionen dieser Arbeit. Sowie unserem Verwaltungspersonal: Sabine Seeger, Gerrit Ohm und Michaela Brodersen.

Besonderer Dank geht zudem an Dr. Hanne Schürmann und Torsten Viohl für das Korrekturlesen dieses Machwerkes.

Abschließend möchte ich noch einen Dank an meine Freunde richten, ihr alle bringt Licht in mein Leben und stärkt mir den Rücken. Vielen Dank!

**Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Friederike Schulz, versichere an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit in Inhalt und Form selbstständig und ohne fremde Hilfe (abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer) angefertigt wurde. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere außerdem, dass keine andere als die angegebene Literatur verwendet wurde. Diese Arbeit hat nie einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen, ist nicht veröffentlicht worden oder wurde zur Veröffentlichung eingereicht. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden und mir wurde niemals ein akademischer Grad entzogen.

Kiel, 31.03.2021

Friederike Schulz