

Aus dem Physiologischen Institut

(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. M. Bleich)

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Zellfreie Expression und Reinigung von Zwei-Porendomänen Kaliumkanälen in
Lipidvesikeln zur Verwendung in Bilayer-Experimenten**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Saskia Buck

aus Bremervörde

Kiel, **2021**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Baukrowitz, Physiologisches Institut

2. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Markus Damme, Biochemisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 04.11.2021

gez.: Prof. Dr. Peer Wulff

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	XI
1. Einleitung	1
1.1 Zwei-Porendomänen Kaliumkanäle (K2P-Kanäle).....	1
1.1.1 Allgemeines.....	1
1.1.2 Aufbau und Gatingverhalten der K2P-Kanäle.....	2
1.1.3 Regulation der K2P-Kanäle.....	3
1.1.4 Physiologie und Pathophysiologie.....	6
1.2 Zellfreie Proteinsynthese.....	9
1.3 Zielsetzung der Arbeit	15
2. Methoden	17
2.1 Auflistung der verwendeten Ionenkanal-DNS.....	17
2.2 In-vitro-Transkription, Reinigung und RNS-Nachweis.....	18
2.2.1 In-vitro-Transkription.....	18
2.2.2 Phenol-Chloroform-Extraktion.....	18
2.2.3 Agarosegelelektrophorese.....	19

2.3 Zellfreie Translation der K2P-Kanäle.....	20
2.3.1 Herstellung der „small unilamellar vesicles“ (SUV).....	20
2.3.2 In-vitro-Translation.....	21
2.4 Auftrennung der zellfrei synthetisierten K2P-Kanäle mit der SDS-PAGE (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).....	22
2.5 Auftrennung der zellfrei synthetisierten K2P-Kanäle im Gradientengel.....	23
2.6 Darstellung der Banden der zellfrei synthetisierten K2P-Kanäle durch Fluoreszenz und Färbemethoden.....	25
2.6.1 Darstellung der Banden durch GFP-Fluoreszenz.....	25
2.6.2 Darstellung der Banden durch Coomassie-Färbung.....	26
2.6.3 Darstellung der Banden durch Silberfärbung.....	26
2.7 Nachweis der zellfrei synthetisierten K2P-Kanäle durch Antikörper im Western Blot.....	27
2.8 Messung der K2P-Ionenkanalströme mit dem Port-a-Patch.....	28
2.8.1 Herstellung von „giant unilamellar vesicles“ (GUV).....	28
2.8.2 Messung der K2P-Ionenkanalströme am Port-a-Patch.....	29
2.9 Messung der K2P-Ionenkanalströme am Orbit Mini.....	31

3. Ergebnisse	33
3.1 In-vitro-Transkription und RNS-Nachweis.....	33
3.2 Herstellung der „small unilamellar vesicles“ (SUV).....	36
3.3 Zellfreie Translation der K2P-Kanäle.....	36
3.3.1 Bestimmung der optimalen Translationszeit.....	37
3.3.2 Solubilisierungsversuche von TREK-2-Proteoliposomen mit verschiedenen Detergenzien.....	40
3.3.3 In-vitro-Translation von TALK-2, TWIK-1, TRESK und THIK-1.....	43
3.3.4 In-vitro-Translation von TRAAK, TALK-1 und KCNK7.....	44
3.3.5 In-vitro-Translation von TASK-1, TASK-2 und TASK-3.....	48
3.4 Messungen der K2P-Ionenkanalströme am Port-a-Patch.....	50
3.4.1 Herstellung von „giant unilamellar vesicles“ (GUV).....	50
3.4.2 Elektrophysiologische Messungen von TREK-2-Einzelkanälen am Port-a-Patch.....	51
3.5 Messungen der K2P-Ionenkanalströme am Orbit Mini.....	54
3.6 Zusammenfassung.....	56
4. Diskussion	57
4.1 Zellfreie Synthese der K2P-Kanäle in Anwesenheit von Liposomen.....	57

4.1.1 In-vitro-Transkription und RNS-Nachweis.....	57
4.1.2 Herstellung und Verwendung der SUV.....	58
4.1.3 Zellfreie Translation.....	59
4.2 Versuche zur Optimierung der zellfreien Expression.....	62
4.2.1 Solubilisierung der Proteoliposomen durch Detergenzien.....	62
4.2.2 Verkürzung der Reaktionsdauer.....	63
4.3 Nachweis der Funktionalität der in vitro synthetisierten K2P-Kanäle durch elektrophysiologische Untersuchungen in planaren künstlichen Membranen.....	64
4.4 Zusammenfassung und Ausblick.....	66
5. Zusammenfassung.....	68
6. Literaturverzeichnis.....	70
7. Anhang.....	84
8. Danksagung.....	93

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat.....	23
BL 1249	(5,6,7,8-Tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)phenyl]- amin.....	4
CECF	engl. continuous-exchange cell-free.....	14
CFCF	engl. continuous-flow cell-free.....	14
DDM	N-Dodecyl β -D-maltosid.....	25
DPhPC	1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine.....	20
DTT	Dithiothreitol.....	18
E. coli	Escherichia coli.....	12
GFP	grün fluoreszierendes Protein.....	25
GUV	engl. giant unilamellar vesicles.....	28,50
HA-Tag	Hämagglutinin-Tag.....	27
hERG-Kanäle	engl. human Ether-a-go-go Related Gene channel.....	66
HEPES-KOH	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure- Kaliumhydroxid.....	18
His-Tag	Polyhistidin-Tag.....	27

ITO	engl. indium tin oxide = Indiumzinnoxid.....	28
K2P-Kanäle	Zwei-Porendomänen Kaliumkanäle.....	1
KCNK7	engl. potassium two pore domain channel subfamily K member 7...7	
M-Domäne	Transmembrandomäne.....	2
MECA-Chip	engl. Micro-Electrode-Cavity-Assay-Chip.....	31
MLV	Multilamellare Vesikel.....	20
MSP	engl. Membrane Scaffold Protein.....	66
MTBST	Milchpulver-Tris-buffered Saline-Tween 20.....	28
NTP	Nukleosidtriphosphat.....	13
P-Domäne	Porendomäne.....	2
PBS	engl. phosphate buffered saline = phosphatgepufferte Salzlösung.....	30
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat.....	6
PVDF	Polyvinylidenfluorid.....	27
RNasen	Ribonukleasen.....	18
SA-Puffer	SUB-AMIX-Puffer.....	21
SDC	engl. sodium deoxycholate = Natriumdeoxycholat.....	25

SDS	engl. sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat.....	22
SDS-PAGE	engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis = Polyacrylamidgelelektrophorese.....	22
SUV	engl. small unilamellar vesicles.....	20,36
TAE	TRIS-Acetat-EDTA.....	19
TALK	engl. TWIK-related alkaline pH activated K ⁺ channel.....	4
TASK	engl. TWIK-related acid sensitive K ⁺ channel.....	4
TEMED	Tetramethylethyldiamin.....	23
THIK	engl. tandem pore domain halothane inhibited K ⁺ channel.....	4
TMS	Transmembransegment.....	2
TRAAK	engl. TWIK-related arachidonic acid-stimulated K ⁺ channel.....	4
TREK	engl. TWIK-related K ⁺ channel.....	3
TRESK	engl. TWIK-related spinal cord K ⁺ channel.....	4
Tween 20	Polyoxyethylenesorbitan monolaurat.....	28
TWIK	engl. two pore weakly inward rectifying K ⁺ channel.....	5

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Unterteilung der fünfzehn humanen K2P-Kanäle in Unterfamilien...1
Abbildung 1.2	Aufbau der Untereinheit eines K2P-Kanals.....2
Abbildung 1.3	Vereinfachte Darstellung einer zellfreien Proteinsynthese mit den nötigen Vorbereitungsschritten.....12
Abbildung 1.4	Vereinfachte Schemata der Batch- und der CECF-Konfiguration....15
Abbildung 2.1	Schema einer Bilayer-Reaktion.....22
Abbildung 2.2	Foto des Gradientenmischers.....24
Abbildung 2.3	Vesicle Prep Pro.....29
Abbildung 2.4	Foto eines Port-a-Patch und einer Ansaugkontrolle.....30
Abbildung 2.5	Aufbau einer Mikrokavität und Foto eines MECA-Chips.....31
Abbildung 2.6	Foto eines Orbit Mini.....32
Abbildung 3.1 a)	Analysen der in vitro transkribierten RNS von TREK-1, TREK-2, TALK-2, TWIK-1, TRESK und THIK-1 durch Agarosegel- elektrophorese.....34

Abbildung 3.1 b)	Analysen der in vitro transkribierten RNS von TRAAK, TALK-1, KCNK7, TASK-1, TASK-2 und TASK-3 durch Agarosegelelektrophorese.....	34
Abbildung 3.2	Darstellung einer degradierten RNS im Agarosegel.....	35
Abbildung 3.3 a), b)	Testung der optimalen Inkubationszeit der Translationsmischung des in vitro synthetisierten K2P-Kanals TREK-1.....	38
Abbildung 3.3 c)	Quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten der Proteinbanden.....	39
Abbildung 3.4 a)	Bestimmung von geeigneten Detergenzien am Beispiel von TREK-2.....	41
Abbildung 3.4 b)	Quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten der Proteinbanden.....	42
Abbildung 3.5	SDS-PAGE-Gel der zellfreien Synthese von TALK-2, TWIK-1, TRESK und THIK-1.....	44
Abbildung 3.6	SDS-PAGE-Gel der zellfreien Synthese von TRAAK, TALK-1 und KCNK7.....	45

Abbildung 3.7	Western-Blot-Analyse der zellfreien Synthese von TRAAK und TALK-1.....	47
Abbildung 3.8	SDS-PAGE-Gel der zellfreien Synthese von TASK-1, TASK-2 und TASK-3.....	48
Abbildung 3.9	Western-Blot-Analyse der zellfreien Synthese von TASK-1, TASK-2 und TASK-3.....	49
Abbildung 3.10	Darstellung der GUV unter dem Lichtmikroskop.....	51
Abbildung 3.11 a)	Darstellung von TREK-2-Ionenkanalströmen.....	52
Abbildung 3.11 b)	Darstellung von TREK-2-Ionenkanalströmen.....	53
Abbildung 3.11 c)	Darstellung eines instabilen Bilayers bei einer Messung am Port-a- Patch.....	54
Abbildung 3.12	Darstellung von TREK-2-Ionenkanalströmen.....	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Ionenkanal-DNS	17
Tabelle 2: Zusammensetzung für zwei SDS-Gele	23
Tabelle 3: Rezept für ein Gradientengel.....	24

Einleitung

1. Einleitung

1.1 Zwei-Porendomänen Kaliumkanäle (K2P-Kanäle)

1.1.1 Allgemeines

Neben den spannungsaktivierten Kv-Kaliumkanälen, den einwärts gleichrichtenden Kir-Kaliumkanälen und den kalziumaktivierten Kaliumkanälen sind die Zwei-Porendomänen Kaliumkanäle (K2P-Kanäle) die vierte und zuletzt entdeckte Gruppe der Kaliumkanäle. Bisher wurden fünfzehn humane K2P-Kanäle kloniert. Diese sind aufgrund ihrer Unterschiede in Struktur und Eigenschaften in sechs Unterfamilien unterteilt (Abbildung 1.1). Einige K2P-Kanäle zeigen eine starke Rektifizierung nach außen (Honoré, 2007). Sie sind entscheidend an der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials beteiligt: Die Aktivität der Kanäle in Ruhe führt dazu, dass sich das Membranpotenzial dem Kalium-Gleichgewichtspotenzial von -90 mV annähert. Die Zellerregbarkeit wird folglich reduziert (Honoré, 2007).

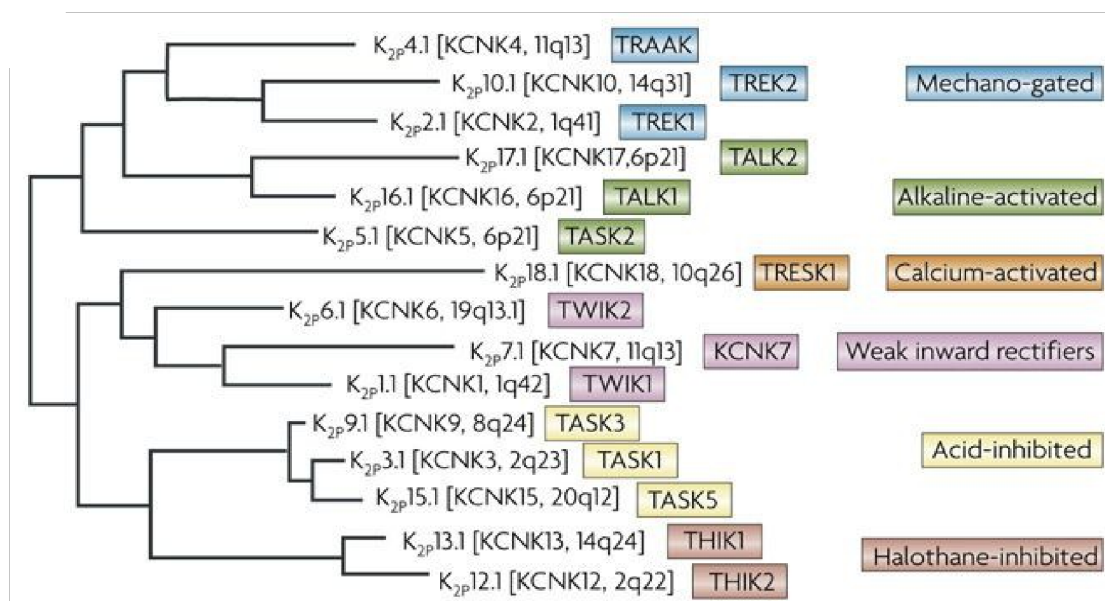


Abbildung 1.1: Unterteilung der fünfzehn humanen K2P-Kanäle in Unterfamilien (Abbildung entnommen aus Honoré, 2007).

Einleitung

1.1.2 Aufbau und Gatingverhalten der K2P-Kanäle

Jeder K2P-Kanal besteht aus einer gleichen Grundstruktur: Eine Kanaluntereinheit besteht aus vier Transmembrandomänen (M-Domänen), zwei Porendomänen (P-Domänen), einer M1P1-Schleife extrazellulär und den N- und C-Termini intrazellulär. Abbildung 1.2 stellt eine Untereinheit eines K2P-Kanals dar. Jede Porendomäne wird von zwei Transmembrandomänen umgeben. Bei der M1P1-Schleife handelt es sich um eine Sequenz, welche sich zwischen erster Transmembrandomäne (M1) und erster Porendomäne (P1) befindet. Die M1P1-Schleife bildet eine Art Kappe und ist eine entscheidende Struktur für den Fluss der Kaliumionen durch den Ionenkanal (Felicciangeli et al., 2015). Zudem existiert ein Selektivitätsfilter, welcher für die Ionenkanalselektivität verantwortlich ist. Vier Porendomänen bilden zusammen den Selektivitätsfilter eines aktiven K2P-Kanals. Folglich dimerisieren die Kanaluntereinheiten zur Bildung eines funktionellen K2P-Kanals. Interessanterweise unterscheiden sich die K2P-Kanäle in diesem Aspekt von den Kv- und den Kir-Kanälen: Diese besitzen pro Untereinheit jeweils nur eine Porendomäne und tetramersieren zur Bildung eines funktionellen Kaliumkanals.

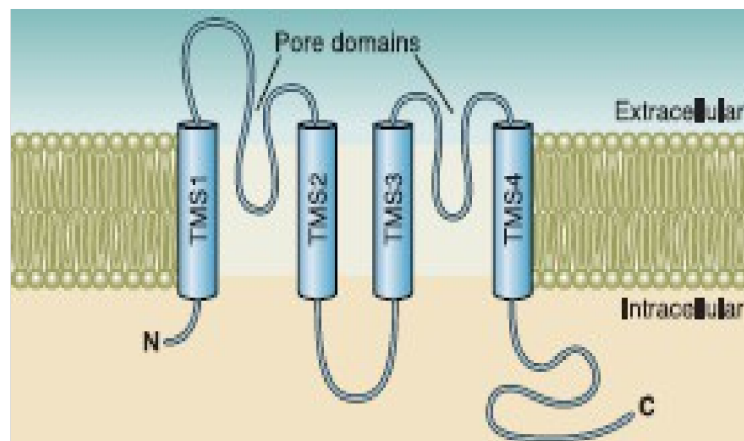


Abbildung 1.2: Aufbau der Untereinheit eines K2P-Kanals (Abbildung entnommen aus Enyedi und Czirják, 2010). Gezeigt sind die vier Transmembransegmente (TMS) 1 - 4 mit den beiden Porendomänen (P1 und P2). TMS1 und TMS2 sind durch die extrazelluläre P1-Schleife verbunden, die die Kappenstruktur bildet. N- und C-Termini liegen intrazellulär.

Einleitung

Für die Kv- und die Kir-Kanäle existieren zwei verschiedene Schaltstellen. Zum einen gibt es das intrazelluläre Aktivierungsgate, das sogenannte Helix-Bundle-Crossing. Weiterhin gibt es das Inaktivierungsgate, welches nahe dem Selektivitätsfilter und nahe dem extrazellulären Bereich des Kanals liegt (Mathie et al., 2010). Für die K2P-Kanäle wurde durch Piechotta et al. (2011) anhand von TREK-1-Kanälen (TREK = engl. TWIK related K⁺ channel) jedoch gezeigt, dass das Helix-Bundle-Crossing konstitutiv offen ist. Somit ist es bei den meisten K2P-Kanälen wahrscheinlich nicht am Gating beteiligt (Mathie et al., 2010). Der Kanal TASK-1 hat zudem ein sogenanntes X-Gate, welches einen entscheidenden Einfluss auf die Physiologie der Kanäle und auf die Wirkung von Pharmaka auf den Kanal hat. Diese Struktur konnte bisher ausschließlich bei dem Kanal TASK-1 nachgewiesen werden (Rödström et al., 2020).

1.1.3 Regulation der K2P-Kanäle

Die K2P-Kanäle werden durch zahlreiche Substanzen und physikalisch-chemische Parameter reguliert. Dies ist insofern interessant, da früher angenommen wurde, die Kanäle seien sogenannte Leckkanäle, welche in Ruhe konstitutiv offen sind. Unter anderem durch die Arbeitsgruppe Baukrowitz konnte gezeigt werden, dass dies nicht der Fall ist. So unterliegen viele Kanäle beispielsweise einem spannungsabhängigen Gatingverhalten (Schewe et al., 2016).

Im Folgenden sind die für die medizinische Forschung bedeutendsten Regulationsmöglichkeiten der K2P-Kanäle beispielhaft aufgeführt.

Regulation durch Pharmaka und Substanzen. Besonders die Regulation der K2P-Kanäle durch diverse Pharmaka hat einen hohen Stellenwert für die Medizin. Interessanterweise zeigen viele Medikamente aus dem neuropsychiatrischen Bereich einen Effekt auf den Öffnungszustand der K2P-Kanäle. So wird der Kanal TREK-1 sowohl durch das Neuroleptikum Haloperidol (Thümmeler et al., 2007) als auch durch das Antidepressivum

Einleitung

Fluoxetin inhibiert (Kennard et al., 2005). Auch der TREK-2-Kanal wird durch Fluoxetin inhibiert (Kim et al., 2012). Der Kanal TREK-1 wird außerdem durch Amlodipin (Liu et al., 2007), Cisplatin (Milosavljevic et al., 2010) und Lidocain (Nayak et al., 2009) inhibiert. Riluzol, ein Pharmakon, welches bei Amyotropher Lateralsklerose einen therapeutischen Stellenwert hat, aktiviert die Kanäle TREK-1 und TRAAK (= engl. TWIK-related arachidonic acid-stimulated K⁺ channel; Duprat et al., 2000).

(5,6,7,8-Tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl]-amin (BL 1249), ein potenzielles Pharmakon, das auf die Myozyten der Urinalblase wirkt, aktiviert die Kanäle TREK-1 und TREK-2 (Tertyshnikova et al., 2004; Schewe et al., 2019). BL-1249 wurde in dieser Arbeit als Aktivator verwendet, um die Funktionalität des in vitro synthetisierten Kanals TREK-2 nachzuweisen (siehe Kapitel 3.5).

Einige Inhalationsanästhetika sind ebenfalls potente Regulatoren der K₂P-Kanäle. So wird der Kanal THIK-1 (THIK = engl. tandem pore domain halothane inhibited K⁺ channel) durch Halothan inhibiert (Rajan et al., 2001). Der Kanal TREK-1 wird durch Chloroform, Diethylether, Halothan und Isofluran aktiviert (Patel et al., 1999). Der Kanal TRESK (= engl. TWIK-related spinal cord K⁺ channel) wiederum wird durch Halothan, Isofluran, Sevofluran und Desfluran aktiviert (Liu et al., 2004). Die Kanäle TASK-1 (TASK = engl. TWIK-related acid sensitive K⁺ channel) und TASK-3 werden durch Halothan, TASK-1 zusätzlich durch Isofluran aktiviert (Patel et al., 1999; Talley und Bayliss, 2002).

Die TALK-Kanäle (= engl. TWIK-related alkaline pH activated K⁺ channel) TALK-1 und TALK-2 werden durch reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid aktiviert (Duprat et al., 2005).

Regulation durch G-Protein-gekoppelte Signalwege. G-Proteine sind membranassoziierte Proteine, welche rezeptorvermittelt moduliert werden. Im Anschluss an eine Rezeptoraktivierung werden die Signale über die G-Proteine und eine Regulationskaskade ins Zellinnere geleitet. Über G_s-Proteine und deren Rezeptoren wird

Einleitung

initial eine Adenylatcyclase stimuliert, während über G_i -gekoppelte Rezeptoren eine Inhibition der Adenylatcyclase hervorgerufen wird. Über G_q -gekoppelte Rezeptoren wiederum wird über einen weiteren Signalweg die Phospholipase C aktiviert. Der Kanal TREK-1 wird sowohl durch Aktivierung der G_s -, als auch durch die G_q -Signalkaskade inhibiert (Fink et al., 1996). Die G_q -gekoppelte Signalkaskade hemmt außerdem die Kanäle TASK-1, TASK-3 und TWIK-1 (TWIK = engl. two pore weakly inward rectifying K^+ channel; Lesage et al., 1996; Chen et al., 2006).

Regulation durch Temperatur und den pH-Wert. Maingret et al. konnten im Jahr 2000 zeigen, dass der Kanal TREK-1 durch eine Erhöhung der Temperatur aktiviert wird. So bewirkt ein Temperaturanstieg um 10 °C einen siebenfach höheren Strom durch den Kanal. Auch die anderen Mitglieder der TREK-Familie, die Kanäle TREK-2 und TRAAK, werden durch Hitze aktiviert. Sie sind bereits bei Körpertemperatur aktiv (Kang et al., 2005). Die Kanäle der TREK-Familie sind außerdem pH-sensitiv. Der Kanal TREK-1 wird zum einen durch intrazelluläre Azidifizierung aktiviert (Maingret et al., 1999), während die gleiche pH-Änderung extrazellulär eine Inhibition hervorruft (Cohen et al., 2008; Sandoz et al., 2009). Der Kanal TREK-2 wird ebenfalls durch einen intrazellulär sauren pH-Wert aktiviert (Bang et al., 2000). Im Unterschied zum Kanal TREK-1 wirkt aber auch eine extrazelluläre Azidifizierung aktivierend (Sandoz et al., 2009). Der Kanal TRAAK wird durch eine intrazelluläre Alkalinisierung aktiviert (Kim et al., 2001) und durch eine extrazelluläre Azidifizierung inhibiert (Sandoz et al., 2009). Auch die Kanäle der TALK- und der TASK-Familie lassen sich durch eine Veränderung des pH-Wertes regulieren (Enyedi und Czirják, 2010). Ein interessantes Regulationsverhalten lässt sich bei dem Kanal TWIK-1 beobachten: Während der Kanal durch intrazelluläre Azidifizierung gehemmt wird (Lesage et al., 1996), bewirkt eine extrazelluläre Azidifizierung eine Änderung der Ionenselektivität: Der Kanal wird dann auch für Natriumionen permeabel (Chatelain et al., 2012).

Regulation durch Membrandehnung und Membranlipide. Es konnte gezeigt werden, dass der Kanal TREK-1 durch einen Anstieg der Osmolarität im Intrazellularraum und der

Einleitung

daraus folgenden Membrandehnung, bedingt durch eine Zunahme des Zellvolumens, aktiviert wird (Patel et al., 1998). Auch die Kanäle TREK-2 und TRAAK werden durch mechanischen Stress aktiviert (Bang et al., 2000; Lesage et al., 2000). Alle Kanäle der TREK-Unterfamilie werden außerdem durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren in der Membran, wie beispielsweise Arachidonsäure, aktiviert. Ein erhöhter Anfall von Arachidonsäure wirkt im Körper entzündungsfördernd, folglich ist die Aktivität der TREK-Kanäle bei entzündlichen Prozessen im Körper erhöht (Patel et al., 1998; Fink et al., 1998; Bang et al., 2000). Der Kanal TRESK wiederum wird durch Arachidonsäure und Docosahexaensäure inhibiert (Sano et al., 2003). TREK-1-Kanäle werden außerdem durch Phospholipide der Zellmembran reguliert: So hat zum Beispiel Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) einen aktivierenden Effekt auf den Kanal (Chemin et al., 2005).

1.1.4 Physiologie und Pathophysiologie

K2P-Kanäle werden in den unterschiedlichsten Geweben und Organen exprimiert, wie z.B. in neuronalen Zellen, Muskelzellen, endokrinen Zellen und in anderen organspezifischen Zellen (Lesage und Lazdunski, 2000). Die verschiedenen K2P-Kanäle zeigen ein sehr unterschiedliches Expressionsmuster. Der Kanal TWIK-1 beispielsweise kommt in zahlreichen Organen und Körpergeweben vor, während der Kanal TALK-1 bisher nur im exokrinen Anteil des Pankreas gefunden wurde.

Nachfolgend sind einige physiologisch und pathophysiologisch relevante Bedeutungen der K2P-Kanäle genannt.

Die Kanäle der TREK-Familie, TREK-1, TREK-2 und TRAAK, werden in zahlreichen Strukturen und Organen des Körpers exprimiert. Alle drei Kanäle finden sich in besonders hoher Dichte im ZNS.

Einleitung

Der Kanal TREK-1 wird zahlreich in kortikalen und subkortikalen Hirnregionen exprimiert, die eine entscheidende Rolle bei pathologischen Vorgängen im Rahmen von Depressionen haben. Dazu zählen zum Beispiel der präfrontale Kortex, die Amygdala, der Hippocampus und das Striatum. Es konnte ergänzend gezeigt werden, dass TREK-1-Knockout-Mäuse eine erhöhte serotonerge Transmission aufweisen und depressionsresistent sind (Fink et al., 1996; Talley et al., 2001; Heurteaux et al., 2006).

Die Kanäle TREK-1, TRAAK, TASK-1, TWIK-2 und KCNK-7 (= engl. potassium two pore domain channel subfamily K member 7) werden in Neuronen der Spinalganglien exprimiert (Maingret et al., 2000; Medhurst et al., 2001). Die Kanäle wirken einer Thermo- und Mechanosensitivierung entgegen. In Knockout-Mäusen wurde zudem eine mechanisch-nozizeptive und eine thermische Hypersensitivität festgestellt. TREK-1-Kanäle werden zudem im anterioren und im präoptischen Hypothalamus exprimiert, wo sich die zentrale Region für die Thermoregulation befindet. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass der Kanal eine Rolle bei der zentralen Thermoregulation spielt (Maingret et al., 2000).

Der TREK-1-Kanal wird zudem stark in der Endothel- und in der Muskelschicht der Arteria basilaris exprimiert (Blondeau et al., 2007). Des Weiteren ist der Kanal in Mesenterialarterien und in Kapillargefäßen der Haut zu finden. In TREK-1-Knockout-Mäusen konnte vergleichend zum Wildtyp gezeigt werden, dass eine Vasodilatation der Gefäße deutlich reduziert war (Garry et al., 2007).

Der Kanal TREK-1 wird vermehrt in malignen Zellen des Prostatakarzinoms exprimiert, während das normale Prostatagewebe und die Prostata bei benigner Hyperplasie nur wenige TREK-1-Kanäle aufweisen. Bei einer induzierten Überexpression des TREK-1-Kanals in normalen Prostata-Zelllinien konnte interessanterweise eine starke Gewebeproliferation festgestellt werden (Voloshyna et al., 2008). Der TREK-1-Kanal stellt somit möglicherweise ein Zielprotein in der Therapie von Prostatakarzinomen dar.

Einleitung

Die Kanäle der THIK-Familie, THIK-1 und THIK-2, werden zahlreich in der Niere exprimiert, besonders im proximalen Tubulus und im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife. THIK-1- und THIK-2-Kanäle werden außerdem stark in den Zellen der Makula densa von Mäusen und Ratten exprimiert und scheinen eine Bedeutung beim tubuloglomerulären Feedback zu haben (Theilig et al., 2008).

Der Kanal TRESK wurde bisher unter anderem im Rückenmark und im Gehirn nachgewiesen (Sano et al., 2003; Liu et al., 2004). TRESK-Kanäle scheinen eine Rolle bei der Entstehung von akuten und chronischen Schmerzzuständen zu spielen (Huang et al., 2008). Mutationen der Gene, welche für den Kanal kodieren, scheinen außerdem eine Bedeutung für die Entstehung von Migräne mit Aura zu haben (Lafrenière und Rouleau, 2011).

Der TASK-2-Kanal, ein Mitglied der TALK-Familie, wird in der Niere, im Pankreas, in der Leber und in geringer Menge auch im Nervensystem exprimiert (Reyes et al., 1998; Talley et al., 2001; Kang und Kim, 2004). Die Kanäle TALK-1 und TALK-2 werden besonders stark im Pankreas exprimiert, jedoch nur im exokrinen Anteil des Organs. Da beide Kanäle im alkalischen pH-Bereich aktiviert werden, scheint eine Beteiligung bei Sekretionsvorgängen im Pankreasdrüsengewebe wahrscheinlich (Girard et al., 2001; Duprat et al., 2005). Der Kanal TALK-2 wird außerdem in der Leber, in der Lunge, im Herz und im Gehirn exprimiert (Girard et al., 2001; Kang und Kim, 2004).

Die Kanäle der TASK-Familie, TASK-1, TASK-3 und TASK-5, werden besonders stark in adrenokortikalen Zellen exprimiert. In den adrenokortikalen Zellen spielt die Inhibition der Kanäle, welche durch Angiotensin 2 erfolgt, eine ausschlaggebende Rolle bei der Aldosteronsekretion (Czirják et al., 2000; Kim und Gnatenco, 2001; Chen et al., 2015). Der Kanal TASK-1 wird außerdem im Herzmuskelgewebe exprimiert und spielt eine Rolle bei dem Auftreten kardialer Arrhythmien (Jones et al., 2002; Besana et al., 2004). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der Kanal TASK-1 in pulmonalarteriellen Muskelzellen exprimiert wird. Der Kanal scheint eine entscheidende Bedeutung bei der pH-

Einleitung

vermittelten hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion zu haben (Gurney et al., 2003). Der Kanal TASK-5 wird in mehreren Organgeweben, wie beispielsweise in Pankreas, Leber, Lunge, Niere, Herz und Hoden, exprimiert. Bisher ist wenig über die Bedeutung des Kanals in diesen Organgeweben bekannt, da der Kanal in gängigen Expressionssystemen nicht zu messbaren Strömen führt (Ashmole et al., 2001).

Die Kanäle der TWIK-Familie, TWIK-1, TWIK-2 und KCNK7, zeigen ein sehr unterschiedliches Expressionsmuster. Der TWIK-1-Kanal wird in zahlreichen Strukturen und Organen exprimiert. So ist der Kanal zum Beispiel in Niere, Gehirn, Lunge, Leber, Pankreas, Plazenta und Herz zu finden (Lesage et al., 1996). In der Niere werden TWIK-1-Kanäle besonders stark im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und im Sammelrohr exprimiert. Es wird eine Beteiligung bei der Rückresorption von Kalium aus dem Tubuluslumen vermutet (Cluzeaud et al., 1998). TWIK-2-Kanäle werden besonders stark in der Plazenta, im Ösophagus, im Magen, in der Milz, in der Aorta und in der Speicheldrüse exprimiert. Kleinere Mengen werden in Lymphknoten, im Knochenmark, in Leukozyten im peripheren Blut und im Thymus gefunden (Patel et al., 2000). Der Kanal scheint außerdem an der Blutdruckregulation beteiligt zu sein (Lloyd et al., 2011). Der Kanal KCNK7 wird unter anderem im Gehirn exprimiert (Salinas et al., 1999). Außer diesem Vorkommen ist bisher wenig über das Expressionsmuster und die pathophysiologische Bedeutung des Kanals bekannt, da er in den gängigen Expressionssystemen keine messbaren Ströme aufweist (Salinas et al., 1999).

1.2 Zellfreie Proteinsynthese

Die Gruppe der K²P-Kanäle zählt, wie auch die anderen Untergruppen der Kaliumkanäle, zu Membranproteinen. Die zellbasierte Herstellung von Membranproteinen in hohen Konzentrationen, wie sie zum Beispiel für Röntgenkristallstrukturanalysen erforderlich ist, ist jedoch sehr schwierig. Bisher konnten K²P-Kanäle bereits durch Hefen und

Einleitung

Insektenzellen exprimiert werden, um Röntgenkristallstrukturanalysen durchzuführen. Allerdings wurden bisher alle verfügbaren Kristallstrukturen am N- und C-Terminus trunziert und es wurden teilweise zusätzliche Mutationen eingebracht, um ein ausreichend hohes Expressionsniveau zu erreichen und die Kanäle der Reinigung und Kristallisation zugänglicher zu machen (Miller und Long, 2012; Brohawn et al., 2012; Brohawn et al., 2013; Brohawn et al., 2014; Dong et al., 2015; Lolicato et al., 2014; Lolicato et al., 2017).

Die zellfreie Proteinsynthese stellt eine interessante Alternative dar, um Membranproteine künftig in voller Länge durch zum Beispiel eine Röntgenkristallstrukturanalyse näher charakterisieren zu können. Unter zellfreier Proteinsynthese versteht man eine in vitro erfolgende Herstellung von Proteinen. Bereits in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden erste zellfreie Synthesen beschrieben. Um den Mechanismus und die Reaktionskomponenten der Translation zu entschlüsseln, wurde die zellfreie Proteinsynthese als alternatives Expressionssystem zu herkömmlich in Laboratorien verwendeten zellbasierten Systemen interessant (Nirenberg und Matthaei, 1961). Es ist gezeigt worden, dass die Zellintegrität keine essentielle Voraussetzung der Proteinsynthese ist. Zur Herstellung von Proteinen genügen die an der Synthese beteiligten Bestandteile der Zelle (Mathews et al., 1971). In den 80er Jahren gelang eine bedeutende Optimierung des zellfreien Synthesystems. Spirin et al. stellten erstmals einen Aufbau vor, in dem die Energieregeneration im Rahmen einer Supplementierung von ATP und GTP etabliert wurde. Durch diese Veränderungen gelang es, die Synthese für eine deutlich längere Zeit aufrecht zu erhalten und die Ausbeute an Protein zu steigern (Spirin et al., 1988).

Für die zellfreie Proteinsynthese ist ein Zellysate notwendig, welches essentielle Komponenten der Translation, wie z.B. Ribosomen, tRNS, Aminoacyl-tRNS-Synthetasen und Faktoren für Initiation, Elongation und Freigabe des synthetisierten Proteins liefert (Jermutus et al., 1998; Schwarz et al., 2007). Zellfreie Proteinsynthesen können entweder gekoppelt oder ungekoppelt durchgeführt werden. Unter einer gekoppelten Reaktion

Einleitung

versteht man, dass Transkription und Translation simultan in einem Reaktionsansatz ablaufen. Folglich handelt es sich bei ungekoppelten zellfreien Proteinsynthesen um Transkriptionen und Translationen, die jeweils separat durchgeführt werden (Junge et al., 2011).

Warum überhaupt ist es sinnvoll, Proteine ohne Zellbasis herzustellen? Zum einen kann eine zu große Menge an synthetisiertem Protein in der Zellkultur-Zelle zu zahlreichen Komplikationen führen: Eine Überexpression kann toxisch auf die Zelle wirken und ihre Vitalität beeinflussen. Außerdem kann es zu Fehlfaltungen kommen und die Proteine können aggregieren (Katzen et al., 2009). Durch die zellfreie Proteinsynthese ist es für viele Proteine nach Optimierung möglich, mit nur geringen Reaktionsvolumina verhältnismäßig viel Protein im Milligrammbereich in kurzer Zeit herzustellen und im Vergleich zur in-vivo-Proteinsynthese eine höhere Ausbeute des gewünschten Proteins zu erzielen (Savage et al., 2007).

Zellfreie Expressionen sind in herkömmlichen Laboratorien durchführbar. Als kodierende Nukleinsäuren lassen sich sowohl Plasmid-DNS, Polymerasekettenreaktionsprodukte, als auch Botenribonukleinsäuren nutzen. Ein weiterer großer Vorteil der zellfreien Synthese ist, dass ununterbrochen Zugang zur Reaktion besteht und beispielsweise jederzeit neue Energiesubstrate supplementiert werden können (Junge et al., 2011). Zellfreie Proteinsynthesysteme bieten freien Zugang für viele Lipide und Detergenzien, welche integrale Membranproteine aus ihrer Bindung mit Membranlipiden lösen können. Dies kann vorteilhaft für weiterführende Analysen der Membranproteine sein. Es können außerdem Aminosäuren gegen andere natürliche oder auch unnatürliche Aminosäuren ausgetauscht werden, um deren spezifische Funktionen im Protein zu untersuchen (Savage et al., 2007). Aminosäure-Positionen können auch isotope markiert und mit Hilfe der Kernspinresonanzspektroskopie untersucht werden (Sobhanifar et al., 2010). Zellfreie Proteinsynthesen bieten außerdem die Möglichkeit, große komplementäre DNS-Banken mit einer hohen Durchsatzgeschwindigkeit zu screenen (Sawasaki et al., 2002a).

Einleitung

Es existieren zellfreie Expressionssysteme sowohl auf Basis prokaryotischer als auch auf Basis eukaryotischer Lysate bzw. Extrakte. Theoretisch lässt sich nahezu jedes Expressionssystem zur Extrakterstellung verwenden. Einige Extrakte haben sich aufgrund ihrer Stabilität und Funktionalität jedoch labortechnisch durchgesetzt.

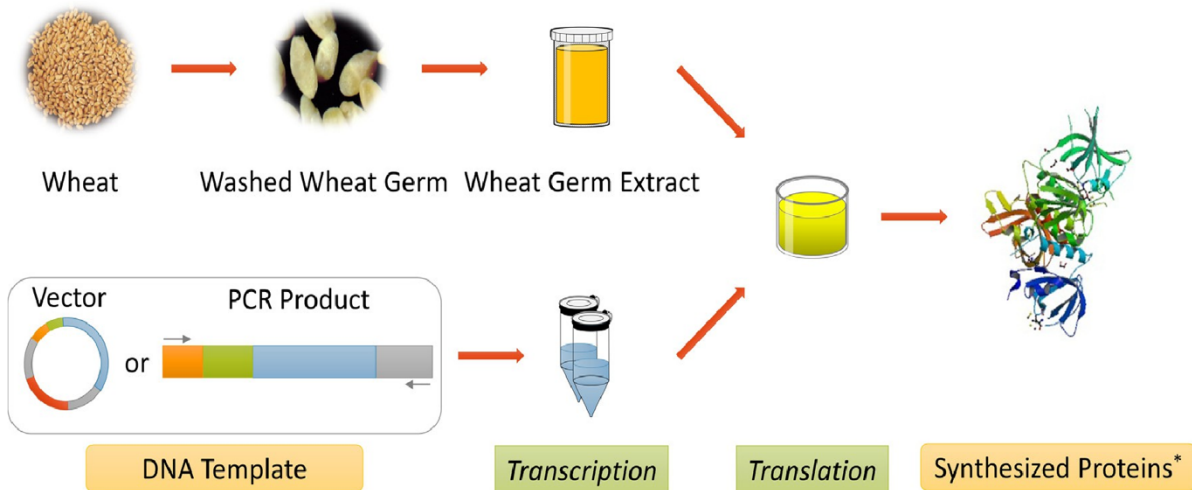


Abbildung 1.3: Vereinfachte Darstellung einer zellfreien Proteinsynthese mit den nötigen Vorbereitungsschritten (Abbildung entnommen aus Harbers, 2014).

Abbildung 1.3 zeigt vereinfacht, wie eine zellfreie Proteinsynthese unter Verwendung des Weizenkeimextraktes als Expressionssystem abläuft. Der Weizenkeimextrakt, welcher auch in dieser Arbeit verwendet wurde, muss zunächst durch mehrere Reinigungsschritte aus der Weizenpflanze gewonnen werden. Als Ausgangsmaterial dient eine DNS-Vorlage des gewünschten Proteins, welche entweder durch Klonierung in einen Expressionsvektor oder direkt aus amplifizierten Polymerasekettenreaktionsprodukten gewonnen werden kann. Zunächst erfolgt die in-vitro-Transkription, hier wird mit Hilfe der DNS-Vorlage ein RNS-Transkript gewonnen. Im Anschluss erfolgt dann die Translation, in der die RNS als Vorlage zur Proteinsynthese dient. Sowohl Transkription als auch Translation erfolgen in Reagenzgläsern.

Eines der am häufigsten verwendeten Systeme ist der Extrakt von *Escherichia coli* (*E. coli*), welcher schon 1961 bei den Versuchen von Nirenberg und Matthaei verwendet wurde. Die Herstellung der *E.-coli*-Extrakte ist zum einen sehr preisgünstig, weiterhin

Einleitung

erfolgt die Extrakterstellung sehr leicht und schnell. E.-coli-Extrakte bieten außerdem einen hohen Ertrag an synthetisiertem Protein und es kann eine Vielzahl an löslichen Proteinen synthetisiert werden (Harbers, 2014). Weitere gängige Expressionssysteme sind unter anderem Extrakte auf der Basis von Kaninchenretikulozyten (Pelham und Jackson, 1976) und Insektenzellen (Ezure et al., 2010).

Ein effizientes eukaryotisches Expressionssystem ist der bereits beschriebene Weizenkeimextrakt. Schon 1973 wurde dieser Extrakt zur zellfreien Translation vom Tabakmosaikvirus und vom Kaninchenglobin-S9 genutzt (Roberts und Paterson, 1973). Nach anfänglichen Schwierigkeiten bezüglich der Stabilität des Systems konnte die Ursache dafür, die Ribosomeninhibition durch weizenkeimeigene Proteine, ausgemacht und durch Reinigung der Reaktionsmischung behoben werden. Des Weiteren wurden am System nicht-translatierende RNS-Regionen, neue Expressionsvektoren und spezialisierte Primer optimiert. Zudem konnte durch den kontinuierlichen Zusatz von Energiesubstraten eine Reaktionszeit von bis zu vierzehn Tagen erreicht werden. Auch der Ertrag an Protein konnte dadurch deutlich gesteigert werden (Sawasaki et al., 2002b).

Verglichen mit anderen eukaryotischen Expressionssystemen lassen sich mit dem Weizenkeimextrakt besonders große Proteinmengen herstellen. Außerdem können mit dem Weizenkeimextrakt hohe Ausbeuten auch großer Proteine um die 200 kDa erzielt werden. Der Extrakt ist kompatibel mit vielen Detergenzien, welche integrale Membranproteine aus ihrer Bindung mit Membranlipiden lösen können. Ein Nachteil des Weizenkeimextraktes ist die sehr zeitaufwendige Herstellung. Für Laboratorien besteht jedoch die Möglichkeit, die Weizenkeimextrakte kommerziell zu erwerben (Harbers, 2014).

Es gibt verschiedene Reaktionsansätze für die zellfreie Proteinsynthese. Im Batch-Verfahren läuft die Reaktion in einem Kompartiment bzw. Reaktionsgefäß ab. Die Reaktionszeiten und die Syntheseausbeuten sind durch den Verbrauch von Energiesubstraten in Form von Nukleosidtriphosphaten (NTP) begrenzt (Jermutus et al.,

Einleitung

1998). Im engl. continuous-flow cell-free-System (CFCF-System) existieren zwei Reaktionskompartimente, getrennt durch eine Dialysemembran. In einem Kompartiment befindet sich der Hauptreaktionsansatz, die eigentliche zellfreie Proteinsynthese, während die Versorgungsmischung, welche Aminosäuren und Energiesubstrate enthält, sich in dem anderen Kompartiment befindet. Durch kontinuierlichen Zufluss von Nukleosidtriphosphaten und Substraten und durch das Abführen von Reaktionsprodukten gelingt es, die zellfreien Reaktionen für längere Zeit aufrechtzuerhalten und somit einen höheren Ertrag an zellfrei synthetisiertem Protein zu gewinnen (Spirin et al., 1988; Junge et al., 2011). Bei der engl. continuous-exchange cell-free-Konfiguration (CECF-Konfiguration) werden die Reaktionsansätze durch eine semipermeable Membran in zwei Kompartimente unterteilt. Die Membran ist permeabel bis zu einer Molekulargröße von ca. 10 kDa bis 50 kDa. Das eine Kompartiment enthält neben dem Zellextrakt andere hochmolekulare Komponenten, wie Enzyme und Nukleinsäurevorlagen. Das zweite Kompartiment enthält niedermolekulare Substanzen, wie Energiesubstrate. Durch Schütteln oder Rühren wird ein Austausch der Substanzen durch die Membran gewährleistet. Ein vereinfachtes weiteres Verfahren ist der Bilayer-Ansatz, in dem der Reaktionspuffer direkt mit der Substratmischung unterschichtet wird. Dieser Ansatz ist gewissermaßen eine vereinfachte CFCF-Konfiguration. Über den Translationsansatz der zellfreien Proteinsynthese wird das Substrat geschichtet. Durch Diffusion werden kontinuierlich Substrate zur Translation zugefügt und Nebenprodukte können wegdiffundieren. In Abbildung 1.4 sind die Batch- und die CECF-Konfiguration dargestellt. Die Bilayerkonfiguration ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

Einleitung

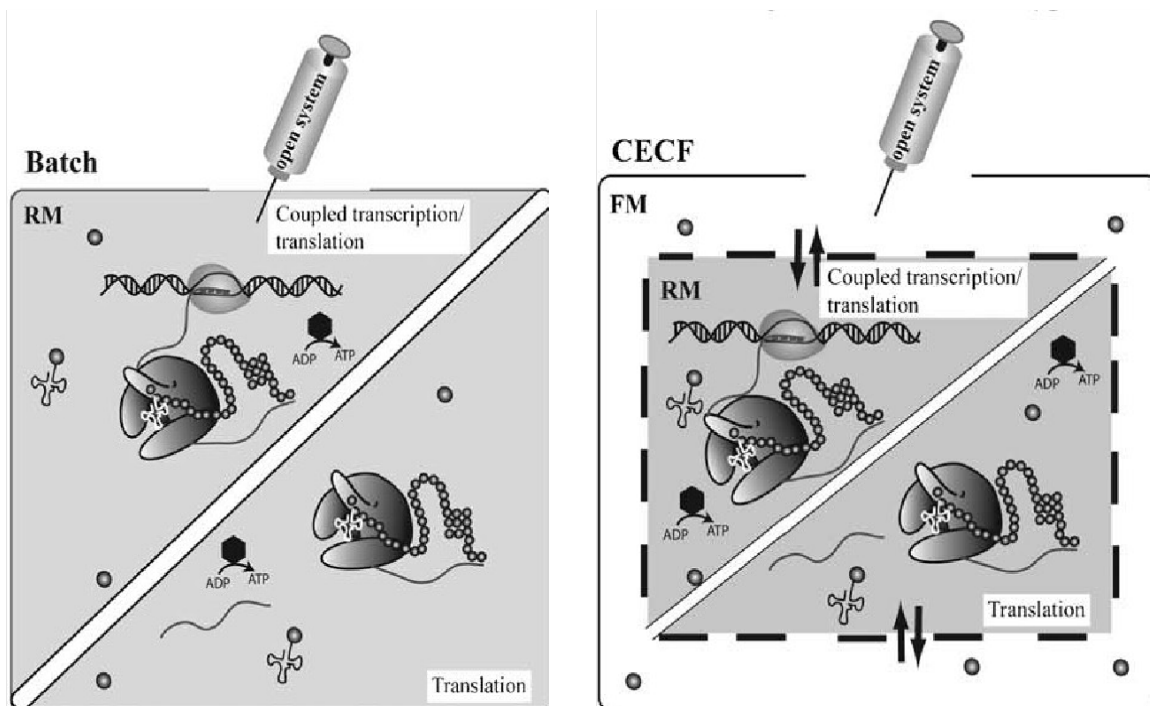


Abbildung 1.4: Vereinfachte Schemata der Batch- und der CECF-Konfiguration (Abbildung entnommen aus Junge et al., 2011).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die klassischen Systeme zur Herstellung rekombinanter Proteine zeigen einige Schwierigkeiten auf. Zum einen ist es oft nur möglich, kleinere Proteine vollständig zu synthetisieren. Besonders große Proteine, wie zum Beispiel ebenso die K2P-Kanäle, können in gängigen Expressionssystemen nicht in voller Länge synthetisiert werden (Whittaker, 2013). Membranproteine, zu denen auch die K2P-Kanäle gehören, sind heutzutage mit einem Anteil von 50 % die häufigste Zielstruktur für Pharmaka (vgl. Kapitel 1.1.3). Es ist somit von enormer Wichtigkeit, die Funktion dieser Proteine zu verstehen. Erkenntnisse über die Funktion von Membranproteinen ergeben sich oft erst aus der dreidimensionalen Struktur der Proteine. Diese kann beispielsweise durch Röntgenkristallstrukturanalysen bestimmt werden. Hierfür wird jedoch eine ausreichend hohe Konzentration an Vollängenprotein benötigt. Diese lässt sich durch die zellfreie

Einleitung

Herstellung von Membranproteinen erreichen. Außerdem kann mit Hilfe der zellfreien Proteinsynthese isoliertes reines Protein gewonnen werden. Bisher ist es noch niemandem gelungen, K2P-Kanäle in voller Länge zellfrei herzustellen. Primäres Ziel dieser Arbeit war es deshalb, systematisch zu untersuchen, welche K2P-Kanäle mithilfe des Weizenkeimextraktes exprimiert werden können.

Elektrophysiologische Untersuchungen der K2P-Kanäle finden oft an Oozyten des Krallenfroschs *Xenopus laevis* statt. In die Oozyten wird normalerweise die RNS des zu untersuchenden Kanals injiziert. Die synthetisierten Kanäle lagern sich anschließend in die Oozytenmembran ein und können mittels Patch-Clamp-Technik charakterisiert werden. Einige der K2P-Kanäle, wie beispielsweise der Kanal KCNK7, zeigen bei der heterologen Expression in Oozyten jedoch keinen messbaren Strom. Bisher waren deshalb nur wenige Untersuchungen an solchen Kanälen möglich und es ist wenig über ihre Eigenschaften bekannt. Die zellfreie Proteinsynthese solcher Kanäle ist deshalb von besonders großem Interesse.

Weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die zellfreie Synthese von K2P-Kanälen zu optimieren, da für weitere Analysen eine ausreichend hohe Kanalproteinausbeute nötig war. Es wurde eine optimierte Inkubationszeit für die in-vitro-Translation bestimmt, weiterhin wurden Detergenzien auf ihre Eignung zur Solubilisierung der zellfrei hergestellten K2P-Kanäle geprüft.

Schließlich sollte durch elektrophysiologische Messungen an dem erfolgreich synthetisierten Kanal TREK-2 die Funktionalität zellfrei hergestellter K2P-Kanäle nachgewiesen werden. Dazu wurden in dieser Arbeit Kanalfunktionsmessungen am Port-a-Patch und am Orbit Mini durchgeführt. Bei diesen Messsystemen handelt es sich um miniaturisierte Patch-Clamp-Systeme, mit denen sich Ströme von Ionenkanälen in künstlichen Membranen messen lassen.

2. Methoden

Das Material inklusive der Herstellerangaben ist der Arbeit im Anhang beigelegt.

2.1 Auflistung der verwendeten Ionenkanal-DNS

Nachfolgend sind alle verwendeten K2P-Kanäle mit der jeweiligen GenBank-Zugangsnummer der DNS aufgeführt. Die Expressionsvektoren wurden durch die Arbeitsgruppe Baukrowitz bereitgestellt. Die Konzentration der DNS wurde photometrisch durch die Messung der Absorption bei 260 nm mit einem Umrechnungsfaktor von 1 Absorptionseinheit = 50 ng doppelsträngige DNS bestimmt.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Ionenkanal-DNS

Ionenkanal	GenBank-Acc. Nr.	Expressionsvektor	Resistenz
TWIK-1	NM_002245.3	pEUmod	Ampicillin
KCNK7	NM_033347.1	pEUmod	Ampicillin
TREK-1	AF004711	pEUmod	Ampicillin
TREK-2	NM_138318.2	pEUmod	Ampicillin
TRAAK	AF247042.1	pEUmod	Ampicillin
TASK-2	NM_003740.3	pEUmod	Ampicillin
TALK-1	NM_032115.3	pEUmod	Ampicillin
TALK-2	EU978944.1	pEUmod	Ampicillin
TASK-1	NM_002246.2	pEUmod	Ampicillin
TASK-3	NM_001282534.1	pEUmod	Ampicillin
THIK-1	NM_022054.3	pEUmod	Ampicillin
TRESK	NM_181840.1	pEUmod	Ampicillin

2.2 In-vitro-Transkription, Reinigung und RNS-Nachweis

2.2.1 In-vitro-Transkription

Bei der Transkription wird die Information der DNS in mRNA umkodiert. Die RNS-Synthese wird von der RNS-Polymerase katalysiert (Stryer Biochemie, 6. Auflage, 2009).

Die jeweils nötige Menge an DNS wurde zunächst anhand ihrer Konzentration bestimmt, sodass sich insgesamt 0,1 µg/µl DNS in jedem Transkriptionsansatz befanden. Die Transkriptionsreaktion hatte ein Endvolumen von 20 µl und enthielt je 25 mM NTP-Mix, bestehend aus jeweils 25 mM ATP, UTP, GTP und CTP, 1 U/µl SP6-RNS-Polymerase und 1 U/µl Ribonuklease-Inhibitor in einfacher Menge Transkriptionspuffer (80 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-Kaliumhydroxid (HEPES-KOH), pH 7,8, 16 mM Magnesiumacetat, 2 mM Spermidin, 10 mM Dithiothreitol (DTT)). Die Reaktionsmischung wurde bei 37 °C für sechs Stunden inkubiert. Der RNS-Syntheserfolg wurde durch eine Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

2.2.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

In einigen Fällen konnte aufgrund einer wahrscheinlichen Kontamination der Probe mit Ribonukleasen (RNasen) keine zellfrei synthetisierte RNS gewonnen werden (vgl. Kapitel 3.1). Hier wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion der verwendeten DNS durchgeführt. Die DNS-Probe wurde zunächst mit Tris-EDTA-Puffer auf insgesamt 100 µl verdünnt. Anschließend wurde die Probe mit einem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, geschüttelt und durch Zentrifugation separiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform versetzt. Anschließend wurde erneut stark geschüttelt und zentrifugiert, der Überstand wurde erneut mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Im Anschluss wurde ein Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat hinzugefügt, daraufhin wurde die Lösung mit zwei Volumen Isopropanol gefällt. Die Probe

Methoden

wurde für 15 Minuten mit 20 000 g bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde erneut verworfen. Das Pellet wurde nun mit Ethanol gewaschen. Die Probe wurde getrocknet und mit destilliertem Wasser versetzt. Die Konzentration der DNS konnte im Anschluss photometrisch bestimmt werden. Zusätzlich wurde eine Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung der Integrität der DNS durchgeführt.

2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient dazu, Nukleinsäurefragmente der Größe nach zu trennen (Der Experimentator Molekularbiologie Genomics, 7. Auflage, 2013).

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Kontrolle der RNS-Integrität nach der in-vitro-Transkription verwendet. Verwendet wurde ein Gel mit einer Agarosekonzentration von 1 % in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer; 40 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 20 mM Essigsäure, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure, pH 8). Nach Schmelzen der Agarose in TAE-Puffer wurden 5 µl des Farbstoffs Roti®-GelStain in die auf ca. 50 °C abgekühlte flüssige Agarose gegeben, um später die Nukleinsäurebanden im Gel sichtbar zu machen. Nach Aushärten des Gels wurde es in eine Gelkammer überführt und diese wurde mit TAE-Puffer befüllt. Je 1 µl RNS-Synthesemischung wurden mit 2,5 µl DNS-Ladepuffer gemischt und aufgetragen. Zum Vergleich wurden 3,5 µl GeneRuler 1 kb DNS-Marker mit aufgetragen. Das Gel wurde für 10 min bei 150 V laufen gelassen. Anschließend wurde die Fluoreszenz der Banden dokumentiert (Biorad Imager, Ethidiumbromid-Filtersatz, Anregungswellenlänge ca. 340 nm, Emissionswellenlänge ca. 600 nm).

2.3 Zellfreie Translation der K2P-Kanäle

2.3.1 Herstellung der „small unilamellar vesicles“ (SUV)

Aufgrund des amphiphilen Charakters von Phospholipiden können sich diese bei der Hydrierung spontan zu sogenannten multilamellaren Vesikeln (MLV) vereinigen. Multilamellar meint damit vielschichtig und beschreibt die zwiebelschalenähnliche Anordnung der Phospholipiddoppelschichten. Werden die multilamellaren Vesikel beschallt, brechen die Schichten auf und es bilden sich kleinere einschichtige Vesikel, die sogenannten engl. „small unilamellar vesicles“ (SUV). SUV besitzen typischerweise einen Durchmesser von bis zu 100 nm (Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics, 6. Auflage, 2010). SUV sind eine Form der Liposomen und dienen dazu, den zellfrei hergestellten Ionenkanälen eine für Membranproteine natürliche Umgebung zu bieten. So können synthetisierte Kanäle kotranslational in die SUV insertieren. Dadurch wird verhindert, dass zellfrei hergestelltes Protein präzipitiert und möglicherweise in Struktur und Funktion geschädigt wird. Liposomen stellen eine Alternative zur Verwendung von Detergenzien dar, um Proteine in löslicher Form herzustellen.

Zunächst wurden je 10 mM Stammlösungen von 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) und Cholesterol in Chloroform gefertigt. Daraus wurde eine 5 mM Lösung im Verhältnis 9:1 (DPhPC:Cholesterol) hergestellt. Die Lösung wurde anschließend in einen Rundkolben überführt und für 15 min mit Stickstoff begast, um den Großteil an Chloroform wieder zu entfernen. Der entstandene Lipidfilm wurde eine Stunde lang einem Vakuum ausgesetzt, um jeglichen Rest an Lösungsmittel zu entfernen. Anschließend wurde HEPES-Puffer hinzu pipettiert, so dass die endgültige Lipidkonzentration 2 mg/ml betrug. Zur Rehydratation wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Resuspension der Lipide wurde anschließend heftig geschüttelt, hierdurch wurde die Lösung trüb. Das Trübwerden ist ein Indikator für die Bildung von multilamellaren Vesikeln. Die trübe Lösung wurde für 30 min im Ultraschallbad, gefüllt mit raumtemperiertem Wasser, belassen, bis die Lösung wieder

Methoden

klar wurde. Das Klarwerden der Lösung ist ein Indikator für die Bildung von SUV. Die SUV wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.3.2 In-vitro-Translation

Bei der Translation werden ausgehend von der mRNA Proteine synthetisiert. Ein Basentriplett der mRNA codiert dabei je eine Aminosäure des synthetisierten Proteins. Die Translation findet an Ribosomen statt. Außerdem sind tRNA und zahlreiche Proteine beteiligt (Stryer Biochemie, 6. Auflage, 2009).

Vorbereitend wurden die SUV aufgetaut (vgl. Kapitel 2.3.1) und für 5 min im Ultraschallbad beschallt. Die Reaktionen wurden auf einer Multititerplatte angesetzt. Pro Reaktion wurden 206 µl SUB-AMIX-Puffer (SA-Puffer, Zusammensetzung: siehe Anhang) vorgelegt. Dieser Puffer entspricht der erwähnten Versorgungsmischung aus Kapitel 1.2 und enthält niedermolekulare Komponenten, wie Aminosäuren und Energiesubstrate. Der SA-Puffer wurde mit einer Mischung aus 10 µl Weizenkeimextrakt, 10 µl mRNA des jeweils verwendeten K₂P-Kanals und 0,8 µl Kreatinkinase unterschichtet. Direkt darüber wurden 10 µl SUV pipettiert, womit sich eine Schichtung der Reaktionsbestandteile ergab. Dieser Ansatz nennt sich Bilayer-Reaktionssystem (vgl. Kapitel 1.2). Abbildung 2.1 zeigt das Schema eines solchen Reaktionssystems. Der Ansatz wurde bei 17 °C für mindestens sechs Stunden inkubiert. Die Proteoliposomen wurden durch Zentrifugation bei 4 °C und 15 000 g abgetrennt und der Überstand wurde verworfen.

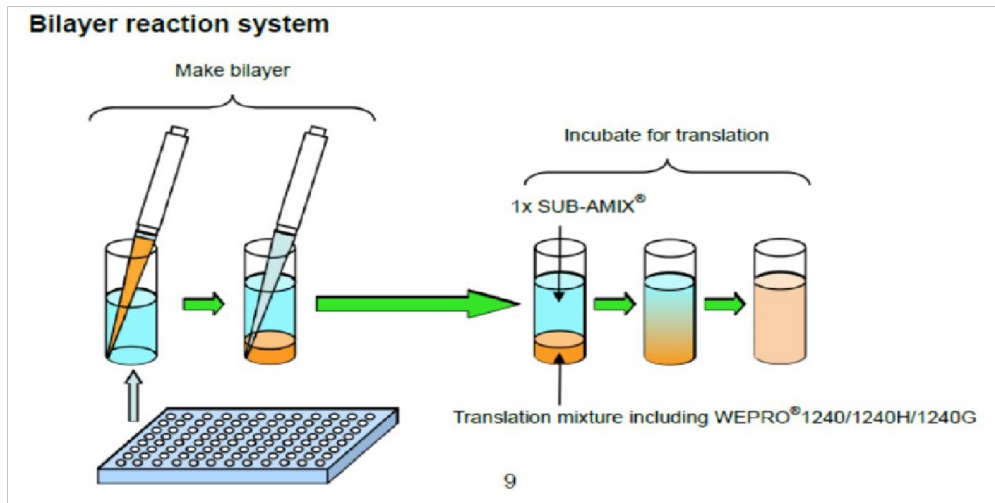


Abbildung 2.1: Schema einer Bilayer-Reaktion (Quelle: cfsciences.com, WEPRO1240/1240H/1240G Expression Kit, Gebrauchsanweisung). „WEPRO 1240/1240H/1240G“ bezeichnet dabei die verschiedenen von CellFree Sciences angebotenen Weizenkeimextrakte.

2.4 Auftrennung der zellfrei synthetisierten K2P-Kanäle mit der SDS-PAGE (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Das anionische Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate = SDS) denaturiert Proteine und versetzt sie mit einer stark negativen Ladung, sodass die verhältnismäßig geringe Eigenladung des Proteins vernachlässigbar wird. Die nun gleichermaßen negativ geladenen Proteine werden im Gel hauptsächlich ihrer scheinbaren molekularen Masse nach aufgetrennt: Je größer ein Protein ist, desto weniger weit wandert es durch die Maschen des Gels und desto näher an der Kathode liegt die Proteinbande entsprechend im Gel (Stryer Biochemie, 6. Auflage, 2009).

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden gemäß dem nachfolgenden Rezept gefertigt (Tabelle 2).

Methoden

Tabelle 2: Zusammensetzung für 2 SDS-Gele

	Trenngel (12,5 % Acrylamid)	Sammelgel (4 % Acrylamid)
Aqua dest.	3 500 µl	1 600 µl
Trenngelpuffer	2 000 µl	-
Sammelgelpuffer	-	670 µl
Acrylamid/Bis (40)	2 500 µl	400 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	6 µl	3 µl
Ammoniumperoxodisulfat (APS 10 %)	60 µl	30 µl

Für die Darstellung im SDS-Gel wurden die lipidhaltigen Proben zunächst einer Acetonfällung unterzogen. Die Überstände wurden mit 800 µl Aceton, die Pellets mit 200 µl Aceton versetzt, heftig geschüttelt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Das Präzipitat wurde bei 15 000 g und 4 °C abgetrennt und der Überstand verworfen, die Pellets wurden mit je 13 µl Laemmli-Puffer versetzt und bei 37 °C und 60 g für eine Stunde partiell denaturiert. Nach erneutem Zentrifugieren bei Raumtemperatur und 2 000 g für 2 min wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde etwa 15 min bis zum Einlaufen der Proben in das Trenngel bei 120 V, anschließend für 35 min bei 200 V durchgeführt. Im Anschluss wurden die Banden je nach Probe durch Fluoreszenz und Färbemethoden sichtbar gemacht (vgl. Kapitel 2.6).

2.5 Auftrennung der zellfrei synthetisierten K2P-Kanäle im Gradientengel

Als Gradientengele werden solche Gele bezeichnet, in denen die Konzentration an Polyacrylamid im Gel linear ansteigt. Gradientengele bieten den Vorteil eines breiteren Trennbereiches. Außerdem sind die Proteinbanden meist schärfer (Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics, 6. Auflage, 2010).

Methoden

Das Gradientengel wurde gemäß dem nachfolgenden Rezept in Anlehnung an das Protokoll von Wittig et al. gefertigt (Tabelle 3; Wittig et al., 2006). Es handelt sich um ein natives Gel, welches die Proteine nicht denaturiert.

Tabelle 3: Rezept für ein Gradientengel

	Sammelgel (4 %)	Trenngel (19 %)	Trenngel (8 %)
Aqua dest.	1 134 μ l	362 μ l	2 514 μ l
Gelpuffer	666 μ l	1 500 μ l	1 667 μ l
AB-3 Mix (s. Anhang)	146,6 μ l	1 727 μ l	808 μ l
Glycerol	-	900 μ l	-
TEMED	1,6 μ l	1 μ l	1 μ l
APS 10 %	16 μ l	10 μ l	10 μ l

Das Gradientengel wurde mit einem Gradientenmischer gefertigt, der von der hausinternen Werkstatt gebaut wurde. Der Gradientenmischer ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

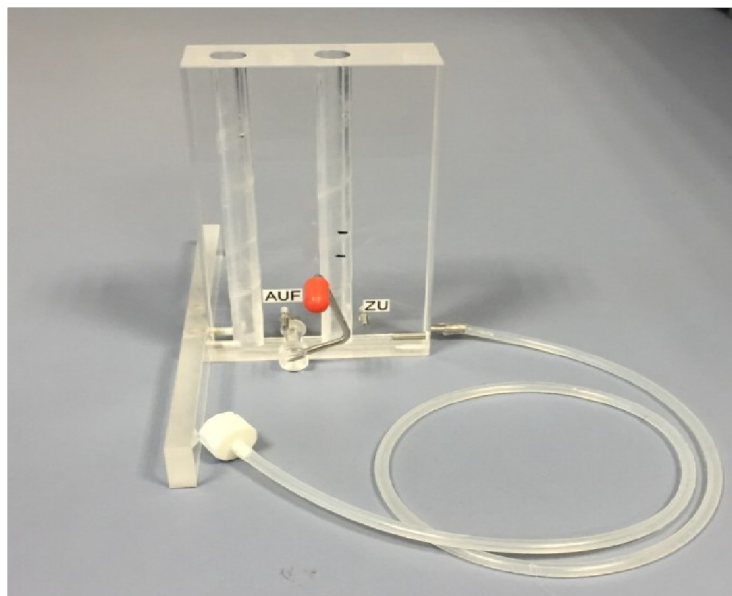


Abbildung 2.2: Foto des Gradientenmischers. Der Gradientenmischer besteht aus zwei Säulen, die über ein Rohr am Säulenboden miteinander verbunden sind. In der rechten Säule wird ein Rührfisch platziert. Über einen Schlauch und einen Dreihahn wird der Gradientenmischer mit einer Kanüle verbunden, deren Nadel die Reagenzien direkt in die Gelkammer leitet (Kanüle hier nicht dargestellt).

Methoden

In die linke Säule der Aperatur wurde die 19%-Trenngel-Lösung, in die rechte Säule die 8%-Trenngel-Lösung gegossen. Die 19%-Gelflüssigkeit wurde bis zum Anfang der 8%-Säule durch kurzes Öffnen des Hebels vorgelassen, anschließend wurde die 8%-Lösung in die rechte Säule pipettiert. Im Anschluss wurde der Hebel komplett geöffnet, sodass sich die beiden unterschiedlich konzentrierten Trenngel-Lösungen mischen und über Schlauch und Kanüle in das Kammersystem fließen konnten. Dadurch wurde ein linearer Gradient erzeugt. Das Gel wurde zum Aushärten über Nacht bei 4 °C belassen, am folgenden Tag konnten die Proben aufgetragen werden.

Alle Proteinpellets wurden zunächst in je 10 µl Wasser und 5 µl Probenpuffer (0,1 % Ponceau S und 25 % Glycerol in Aqua dest.) gelöst. Für die final 1%-konzentrierten Proben wurden je 2 µl DDM (N-Dodecyl β-D-maltosid) bzw. SDC (engl. sodium deoxycholate = Natriumdeoxycholat) und je 3 µl Wasser hinzugefügt. Für die final 1,5%-konzentrierten Proben wurden je 3 µl DDM bzw. SDC und 2 µl Wasser hinzugefügt. Anschließend wurde für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Danach wurde für 10 min bei 2 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, welcher die aus den Proteoliposomen solubilisierten Kaliumkanäle enthält, wurde abgenommen, mit je 10 µl Probenpuffer versetzt und im Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei 4 °C für 10 min auf 100 Volt und dann für 3 Stunden auf 120 Volt durchgeführt.

2.6 Darstellung der Banden der zellfrei synthetisierten K2P-Kanäle durch Fluoreszenz und Färbemethoden

2.6.1 Darstellung der Banden durch GFP-Fluoreszenz

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) ist ein fluoreszierendes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*. GFP lässt sich durch blaues und durch ultraviolettes Licht anregen und strahlt ohne nötige Substrate oder Kofaktoren grünes Licht ab. Es lässt sich aufgrund

Methoden

ähnlicher Anregungs- und Emissionsmaxima mit den üblichen Fluoreszenzfiltern für Fluoresceinfarbstoffe nachweisen (Der Experimentator Molekularbiologie Genomics, 7. Auflage, 2013).

Da die Kaliumkanäle TREK-1 und TREK-2 C-terminal mit GFP markiert waren, konnten diese Proteinbanden im Gel durch Fluoreszenz nachgewiesen werden, sofern Vollängenprotein entstanden ist. Hierfür wurde das ChemiDoc™ MP Imaging System (Biorad, Filter „Anregung mit blauem LED-Auflicht, Emissionsfilter 532/28 nm“) verwendet.

2.6.2 Darstellung der Banden durch Coomassie-Färbung

Coomassie ist ein blauer Farbstoff, mit dem sich Proteinbanden anfärben lassen. Durch Verwendung von kolloidalem Coomassie kann die Proteinnachweisgrenze zusätzlich verringert werden (Dyballa und Metzger, 2009).

Das Gel wurde zunächst für 20 min in Essigsäure-Ethanol-Fixierlösung (10 % Essigsäure, 40 % Ethanol) geschüttelt. Anschließend wurde über Nacht in 50 ml Colloidal Coomassie geschüttelt. Am nächsten Tag wurde das Gel mit destilliertem Wasser entfärbt.

2.6.3 Darstellung der Banden durch Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine Färbemethode mit sehr hoher Empfindlichkeit. Das Silberion komplexiert hierbei mit verschiedenen Aminosäureresten. Durch Entwickeln mit Formaldehyd wird das Silberkation zu Silber reduziert. Dies macht die Proteinbanden durch Schwärzung sichtbar (Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics, 6. Auflage, 2010).

Methoden

Während der gesamten Färbung wurde das Gel geschüttelt. Zunächst wurde das Gel für je 5 min in Fix I (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) und Fix II (10 % Ethanol, 15 % Essigsäure) inkubiert. Nach fünf Waschgängen mit 60 °C heißem Wasser für je 2 min wurde für 30 s mit Farmerschem Abschwächer (25 ml Lösung A (25 g Kaliumhexacyanidoferrat(III) in 500 ml Aqua dest.) + 25 ml Lösung B (50 g Natriumthiosulfat in 500 ml Aqua dest.)) reduziert. Anschließend wurde sechsmal je 2 min mit 60 °C heißem Wasser gewaschen. Im Anschluss wurde für 12 min mit 0,2 % Silbernitrat, gelöst in Aqua dest., gefärbt. Daraufhin wurde für 90 s mit Wasser gewaschen. Es wurde dann zweimal für je 30 s entwickelt (Natriumcarbonat 2,9 % + Formaldehyd 0,08 % in Aqua dest.). Abschließend wurde mit 10 % Essigsäure gestoppt.

2.7 Nachweis der zellfrei synthetisierten K2P-Kanäle durch Antikörper im Western Blot

Beim Western Blotting werden Proteinbanden aus Gelen durch Anlegen einer Spannung auf eine Membran übertragen. Anschließend kann das Protein mit Antikörpern gegen spezifische Proteinstrukturen nachgewiesen werden (Der Experimentator Molekularbiologie Genomics, 7. Auflage, 2013).

Alle zellfrei synthetisierten K2P-Kanäle besaßen N-terminal einen Polyhistidin-Tag (His-Tag) und C-terminal einen Hämagglutinin-Tag (HA-Tag). Durch Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen diese beiden Markierungen war es möglich, die Kaliumkanäle durch Western Blotting nachzuweisen.

Verwendet wurde die WetBlot-Methode. Hier findet das Blotting komplett in Puffer statt. Die verwendete Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) wurde vorbereitend für 30 s im Methanolbad geschwenkt und anschließend, wie auch das Gel, für 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Es wurde eine Stunde bei 350 mA auf Eis geblottet.

Methoden

Anschließend wurde die Membran für eine Stunde in 3 % Milchpulver-Tris-buffered Saline-Tween-20 (Milchpulver-TBST; Tween 20 = Polyoxyethylenesorbitan monolaurat) blockiert. Danach wurde der erste Antikörper appliziert: Der His-Antikörper wurde 1:10.000 in 10 ml Milchpulver-TBST verdünnt, während der HA-Antikörper 1:5.000 in 10 ml MTBST verdünnt wurde. Inkubiert wurde über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde dreimal für 15 min mit TBST gewaschen. Nach Inkubation mit dem zweiten Antikörper (goat anti-mouse, 1:10.000 auf 10 ml MTBST) für eine Stunde wurde erneut wie oben beschrieben gewaschen. Abschließend wurden 2 ml Clarity™ Western ECL Blotting Substrat hinzu pipettiert und die Membranen wurden für 5 min im Dunkeln inkubiert. Die Chemilumineszenz der Proteinbanden der zellfrei synthetisierten K2P-Kanäle wurde mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System detektiert.

2.8 Messung der K2P-Ionenkanalströme mit dem Port-a-Patch

2.8.1 Herstellung von „giant unilamellar vesicles“ (GUV)

Engl. „giant unilamellar vesicles“ (GUV) sind, ebenso wie SUV, Lipidvesikel. Ihr Durchmesser ist jedoch im Vergleich zu den SUV größer. GUV lassen sich im Mikroskop darstellen (siehe Abbildung 3.10).

Für die GUV-Präparation wurden die gleichen Lipidstammlösungen der SUV-Herstellung verwendet (siehe Kapitel 2.3.1). Als Reaktionsraum wurden Glasplatten aus Indiumzinnoxid (sog. ITO-slides, ITO = engl. Indium-tin-oxide; Nanion, München) verwendet. Diese sind beschichtet und leitfähig und können als Elektroden fungieren. Auf die ITO-Glasplatten wurde zunächst ein mit Vakuumfett beschichteter Gummiring platziert, um einen abgedichteten Reaktionsraum zu schaffen. In den Ring wurden 20 µl der Lipidstammlösung pipettiert. Das restliche Chloroform wurde unter einem Stickstoffstrom entfernt, so dass ein Lipidfilm zurückblieb. Anschließend wurden 150 µl 1 M Sorbitol auf den Lipidfilm pipettiert. Die Glasplatte wurde mit einer zweiten ITO-

Methoden

Glasplatte abgedichtet und im „Vesicle Prep Pro“ (Nanion, München; siehe Abbildung 2.3) platziert. Durch Anlegen einer Spannung von 3 V und 5 Hz für 120 min (Einstellung „Base Protocol“) wurden GUV durch Elektroformation gebildet.



Abbildung 2.3: Vesicle Prep Pro (Quelle: <https://www.nanion.de/en/products/vesicle-prep-pro.html>).

2.8.2 Messung der K₂P-Ionenkanalströme am Port-a-Patch

Der Port-a-Patch (Nanion, München) ist ein miniaturisiertes Patch-Clamp-System, mit dem Bilayer-Messungen möglich sind. Das System besteht aus der Port-a-Patch-Einheit, dem Verstärker (EPC-10, HEKA, Lambrecht (Pfalz)), einer Pumpe und dem Rechner mit dem Programm „Patchmaster“ zur Aufzeichnung der Messdaten.

Die Port-a-Patch-Einheit besteht aus zwei Silber-/Silberchlorid-Elektroden, zwischen denen ein Borosilikat-Chip mit einer mikrometergroßen Öffnung platziert wird. Sowohl unter als auch auf den Chip werden die Kalium-Messlösungen appliziert. Die GUV-Lösung wird anschließend auf den Chip pipettiert. Durch Erzeugen eines Unterdrucks werden die GUV angesaugt und aufgebrochen. Dadurch bildet sich ein Bilayer in der Apertur. Dieser Bilayer dichtet die Öffnung elektrisch ab, wodurch ein hoher Abdichtungswiderstand, das Gigaseal, entsteht. Der Bilayer stellt ein Äquivalent zur Zellmembran dar und trennt die

Methoden

beiden Kaliumlösungen, welche dem Intra- und Extrazellulärraum entsprechen, voneinander. Abbildung 2.4 zeigt den Port-a-Patch und die Ansaugkontrolle.

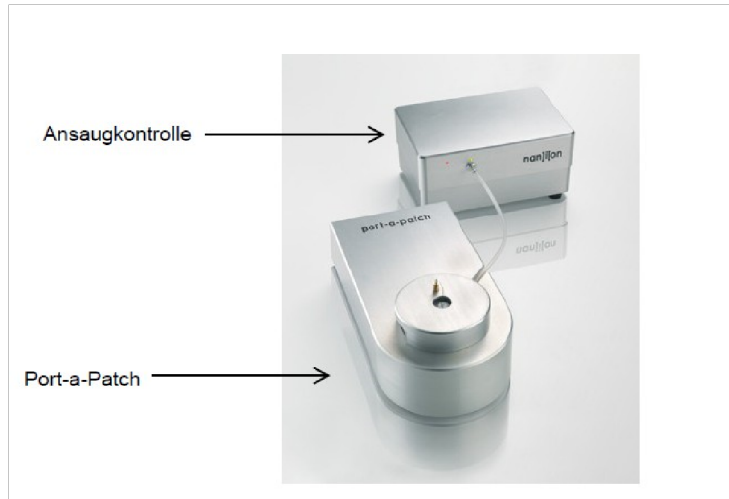


Abbildung 2.4: Foto eines Port-a-Patch und einer Ansaugkontrolle (nanion.de; Quelle: <https://www.autom8.com/port-patch-planar-patch-clamping/>).

Vorbereitend wurden beide Silberelektroden des Port-a-Patch chloridiert. Für die Messungen der Ionenkanalströme am Port-a-Patch wurden die in Liposomen zellfrei synthetisierten Ionenkanäle (bzw. deren Pellets) direkt nach der Translation und Zentrifugation (siehe Kapitel 2.3.2) in 20 μl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS = engl. phosphate buffered saline) gelöst. Es wurden 5 μl Kaliumlösung unter und 7 μl Kaliumlösung (Konzentrationsangaben: siehe Abbildungen 3.11 a) und b)) auf den Chip pipettiert. Der Chip wurde durch die Kaliummesslösungen mit den Elektroden in Kontakt gebracht. Anschließend wurden 3 μl GUV-Lösung auf den Chip pipettiert. Nach Ansaugen der GUV und Formation eines Bilayers wurden 1 μl der resuspendierten proteinhaltigen Liposomen appliziert. Die Messungen wurden bei verschiedenen Potenzialen von -40 mV bis +40 mV durchgeführt und wiederholt.

2.9 Messung der K2P-Ionenkanalströme am Orbit Mini

Der Orbit Mini (Nanion, München; Abbildung 2.6) eignet sich ebenso wie der Port-a-Patch zur Messung von Ionenkanalströmen der zellfrei synthetisierten K2P-Kanäle. Mit dem Orbit Mini ist es möglich, parallel vier Bilayer zu erzeugen und somit vier Messungen gleichzeitig durchzuführen. Dies ist möglich, da der für dieses System gebräuchliche engl. „Micro-Electrode-Cavity-Assay“-Chip (MECA-Chip) vier Mikrokavitäten besitzt. In diesen werden die Bilayer durch „Painting“ erzeugt. Unter „Painting“ versteht man die Verteilung des in Oktan gelösten Lipids (hier DPhPC) über der Mikrokavität mit einem feinen Pinsel. Durch das Wischen wird auf simple Weise ein Bilayer in den Mikrokavitäten generiert, wodurch wiederum ein Gigaseal gebildet wird. Jede Kavität enthält eine integrierte Silber-/Silberchlorid-Mikroelektrode. Somit wird, wie auch schon beim Port-a-Patch, eine Zellmembran mit getrenntem Intra- und Extrazellulärraum simuliert (Abbildung 2.5). Der Orbit Mini enthält außerdem einen integrierten miniaturisierten 4-Kanal-Verstärker. Der Orbit Mini kann über ein USB-Kabel an einen Computer angeschlossen werden, welcher die Messdaten über das Programm EDR3 (elements SRL, Cesena, Italien) erfasst.

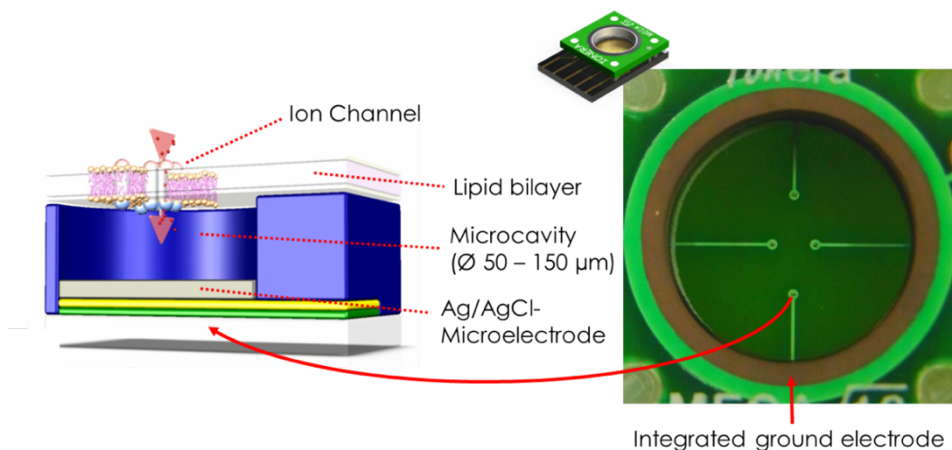


Abbildung 2.5: Aufbau einer Mikrokavität und Foto eines MECA-Chips (Ionera, Freiburg; Quelle: https://www.nanion.de/images/Images_tiff_jpg_png/Products_OrbitMini/MECA_4_1.png).

Methoden



Abbildung 2.6: Foto eines Orbit Mini (Nanon, München; Quelle: <https://www.ionera.de/products.htm>).

Es wurden 150 μ l 200 mM Kalium-Messlösung auf den MECA-Chip appliziert. Anschließend wurden Bilayer aus DPhPC (1 mg/ml in Oktan gelöst) durch Painting erzeugt. Für die Ionenkanalstrommessungen am Orbit Mini wurden die zellfrei synthetisierten K2P-Kanäle bzw. deren Pellets direkt nach der Translation und Zentrifugation in PBS resuspendiert. Diese Lösung wurde anschließend auf die Bilayer pipettiert. Die Messungen wurden bei verschiedenen Potenzialen von -80 mV bis +80 mV durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 In-vitro-Transkription und RNS-Nachweis

Die Möglichkeit der zellfreien Synthese sollte für alle K2P-Kanäle, deren kodierende Sequenzen im Labor zur Verfügung standen, systematisch untersucht werden. Dazu wurde zunächst die RNS in vitro transkribiert. Der verwendete Expressionsvektor besaß einen SP6-Promoter, es wurde deshalb eine kommerziell erhältliche SP6-Polymerase verwendet.

Ein kritischer Faktor der zellfreien Transkription ist die Gefahr der Kontamination mit RNasen. Diese kommen nahezu ubiquitär vor und sind Ribonukleinsäure-spaltende Enzyme (Der Experimentator Molekularbiologie Genomics, 7. Auflage, 2013). RNasen lassen sich beispielsweise in hoher Zahl auf der Hautoberfläche finden. Sie sind antimikrobiell aktiv und schützen den Wirt unter anderem vor pathogenen Mikroorganismen (Rademacher et al., 2016). Durch das ubiquitäre Vorkommen ist eine Verunreinigung der Proben und der Ausgangsreagenzien mit RNasen leicht möglich. Eine weitere Quelle einer RNase-Kontamination der In-vitro-Transkriptionsreaktion kann auch die Template-DNS sein. Daher wurden alle zur Verfügung stehenden DNS durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt (vgl. Kapitel 2.2.2).

Insgesamt konnten nach erfolgreicher Reinigung zwölf der fünfzehn codierenden Sequenzen für K2P-Kanäle in vitro transkribiert werden. Dies entsprach allen im Labor zur Verfügung stehenden K2P-Kanal-DNS.

Zur Überprüfung der Integrität der RNS nach der In-vitro-Transkription wurde stets eine analytische Gelelektrophorese durchgeführt. Die nachfolgenden Abbildungen (3.1 a) und 3.1 b)) zeigen die Fluoreszenzaufnahmen der in vitro synthetisierten RNS der insgesamt zwölf getesteten K2P-Kanäle (Filter Ethidiumbromid, ChemiDoc™ MP Imaging System, BioRad). In allen Fällen sind jeweils gut abgrenzbare Banden in Bereichen von ca. 1 000 bp bis 3 000 bp sichtbar.

Ergebnisse

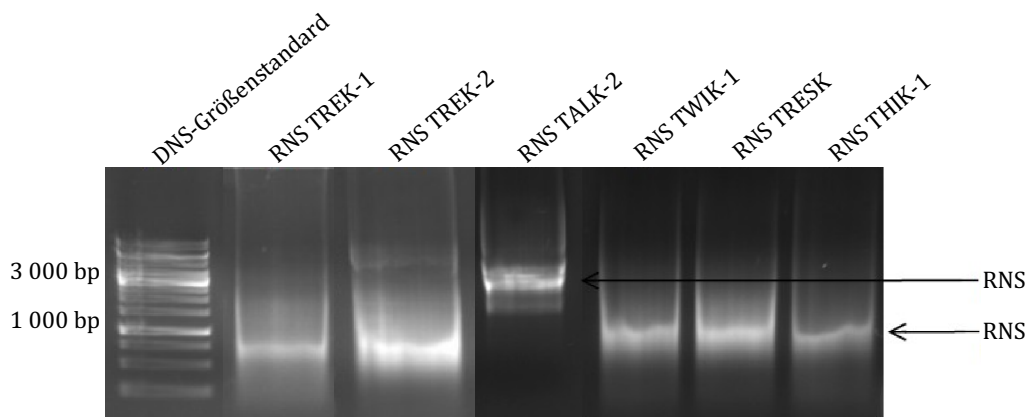


Abbildung 3.1 a): Analysen der in vitro transkribierten RNS von TREK-1, TREK-2, TALK-2, TWIK-1, TRESK und THIK-1 durch Agarosegelelektrophorese. Filtereinstellung „Ethidiumbromid“ mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System.

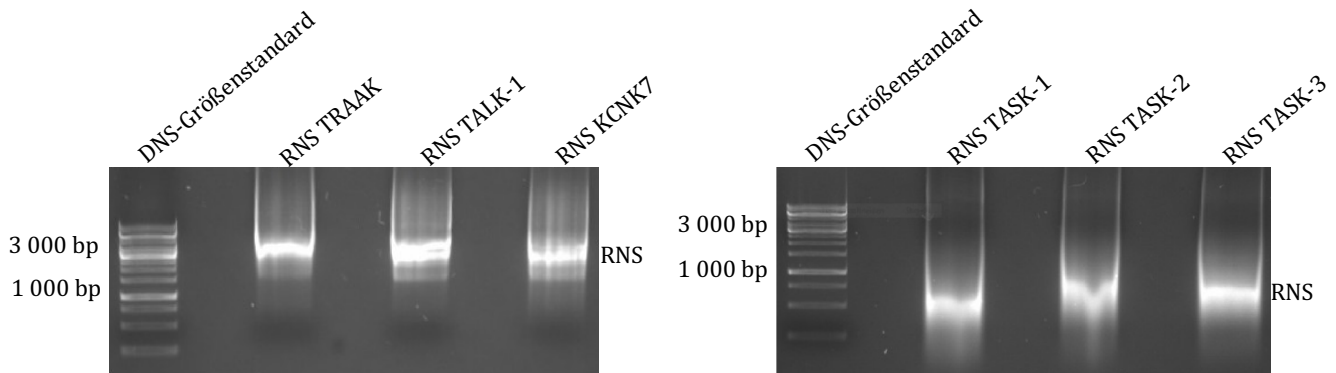


Abbildung 3.1 b): Analysen der in vitro transkribierten RNS von TRAAK, TALK-1, KCNK7, TASK-1, TASK-2 und TASK-3 durch Agarosegelelektrophorese. Filtereinstellung „Ethidiumbromid“ mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System.

Erwähnenswert ist, dass die Höhe der RNS-Bande im Gel relativ zu betrachten ist. Aufgrund der Einzelsträngigkeit kann RNS intramolekulare Basenpaarungen eingehen. Dies kann zu einer die Molekulargröße verfälschenden Sekundärstruktur führen. So kann es vorkommen, dass die Banden in einigen Fällen in nieder- (TASK-1, TASK-2, TASK-3) oder höhermolekulareren Bereichen (TALK-2, TRAAK, TALK-1, KCNK7) zu finden sind.

Erwähnenswert ist zudem, dass die verwendete Plasmid-DNS keinen Transkriptionsterminator enthielt. Somit konnten die Transkripte je nach Prozessivität der Polymerase in ihrer Länge variieren. Zudem ist die Größenbestimmung von RNS normalerweise mithilfe eines anderen Elektrophoreseverfahrens, in dem die RNS einer Denaturierung unterworfen wird, feststellbar. Da die Methode im Labor jedoch nicht

Ergebnisse

angewendet wurde und da der RNS-Nachweis ausschließlich der Beurteilung der Integrität diente, wurde die in vitro transkribierte RNS ebenso wie DNS in einem konventionellen Gel aufgetrennt.

Im Anschluss ist das Beispiel einer degradierten RNS, hervorgerufen durch RNase-Kontamination, gezeigt (Abbildung 3.2).

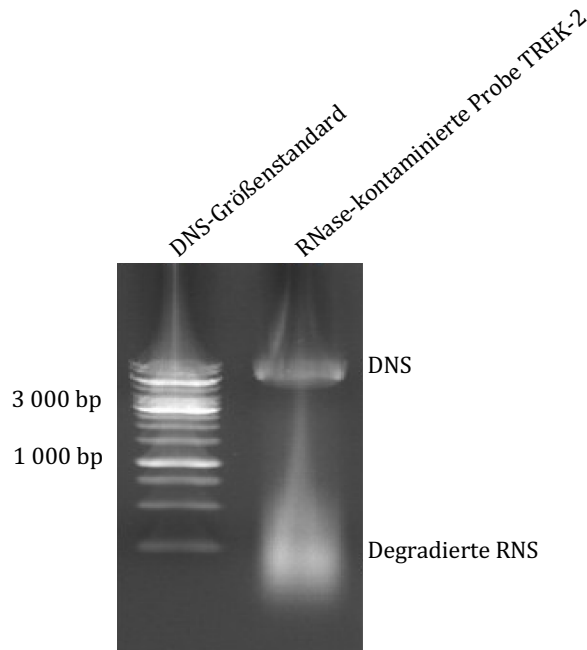


Abbildung 3.2: Darstellung einer degradierten RNS im Agarosegel. Filtereinstellung „Ethidiumbromid“ mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System.

Die Abbildung zeigt ein Agarosegel mit dem Resultat nach zellfreier Transkription von TREK-2. In der ersten Spur ist ein Größenstandard sichtbar, in der zweiten Spur wurde eine Probe der zellfreien Transkription von TREK-2 aufgetragen. Zum einen ist eine relativ breite und verwaschene Bande im niedermolekularen Bereich zu sehen. Außerdem lässt sich eine schärfere Bande im höhermolekularen Bereich finden.

In diesem Versuch kann davon ausgegangen werden, dass die Probe RNase kontaminiert war. Durch das Enzym RNase wird synthetisierte RNS gespalten und diese weist resultierend eine geringe Molekularität als intakte RNS auf und hat dementsprechend eine größere Laufweite im Agarosegel. Durch die unterschiedlichen Spaltungslängen durch das Enzym RNase sind degradierte RNS zudem an einer Art „Schmier“ im Gel erkennbar. Da in

Ergebnisse

Abbildung 3.2 dieser beschriebene „Schmier“ im niedermolekularen Bereich des Gels zu finden ist, wird die Vermutung einer RNase-Kontamination verstärkt.

Insgesamt lässt sich nach Betrachtung der Ergebnisse (siehe Abbildung 3.1 a) und b)) schließen, dass die synthetisierte RNS dazu geeignet ist, für folgende Experimente eingesetzt zu werden.

3.2 Herstellung der „small unilamellar vesicles“ (SUV)

Die zellfrei synthetisierten Ionenkanäle benötigten zur Stabilisierung und zur Verhinderung einer Denaturierung ein membranähnliches Milieu. Durch Denaturierung kann das synthetisierte Protein aggregieren und präzipitieren, so dass Struktur und Funktion nicht mehr gewährleistet sind. Deshalb wurden der Translationsmischung Liposomen hinzugefügt. In dieser Arbeit wurden Liposomen in Form von SUV verwendet. SUV sind unilamellare kleine Lipidvesikel. In diese konnten die K2P-Kanäle direkt nach ihrer in-vitro-Synthese insertieren. Die genaue Herstellung der SUV ist in Kapitel 2.3.1 beschrieben. Das getrocknete Lipid wurde für eine Stunde in Puffer rehydriert und die Lipidschichten wurden durch heftiges Schütteln gelöst. Die Trübung der Mischung zeigte an, dass sich die multilamellaren Vesikel gebildet hatten. Durch anschließende Sonifikation lagerten sich die multilamellaren Vesikel in SUV um, was sich durch ein Aufklaren der Lösung zeigte. Es konnte dann von einer erfolgreichen SUV-Bildung ausgegangen werden, da die einschichtigen SUV eine andere Lichtstreuung aufweisen als die mehrschichtigen MLV.

3.3 Zellfreie Translation der K2P-Kanäle

Nach der erfolgreichen in-vitro-Transkription und der Vorbereitung der SUV wurde nun die zellfreie Translation durchgeführt. Ein kritischer Faktor der zellfreien Translation ist das verwendete Expressionssystem. In dieser Arbeit wurde ein kommerziell erhältlicher

Extrakt aus Weizenkeimen eingesetzt (siehe Kapitel 2.3.2 sowie Anhang). Die prinzipielle Eignung des Weizenkeimsystems zur Synthese von K2P-Kanälen war in der Arbeitsgruppe durch Vorversuche bekannt. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass die zellfreie Synthese von TREK-1 und TREK-2 in diesem Weizenkeimsystem erfolgreich war. Aus diesem Grund wurden diese beiden K2P-Kanäle als Ausgangspunkt genutzt, um die zellfreie Synthese zu optimieren. TREK-1 diente zur Bestimmung der optimalen Translationszeit. TREK-2 wurde genutzt, um ein geeignetes Detergenz in der richtigen Konzentration zu finden, um für weitere Analysen ausreichend solubilisiertes und zellfrei hergestelltes Protein zu gewährleisten.

3.3.1 Bestimmung der optimalen Translationszeit

Zunächst stellte sich die Frage, wie lange eine in-vitro-Translation inkubieren muss, um ausreichend Protein für spätere Analysen und Ionenkanalmessungen zu exprimieren. Um diese Frage zu beantworten, wurden vier Translationsansätze, welche unterschiedlich lange inkubiert wurden, verglichen (siehe Abbildungen 3.3). Allen Reaktionsansätzen wurden Liposomen in Form von SUV hinzugefügt. Die Ansätze wurden für drei Stunden, sechs Stunden, neun Stunden und über Nacht inkubiert. Die Liposomen, welche nach der jeweiligen Inkubationszeit die synthetisierten K2P-Kanäle enthielten, wurden im Anschluss zentrifugiert und im SDS-Gel aufgetrennt. Die Überstände sind nachfolgend mit aufgetragen, um zu kontrollieren, ob sich noch Protein in diesen befand.

Abbildung 3.3 a) und b) zeigen jeweils ein SDS-PAGE-Gel. Abbildung 3.3 a) zeigt zunächst die detektierte Fluoreszenz der Proteinbanden. Abbildung 3.3 b) zeigt dasselbe SDS-PAGE-Gel nach Anfärbung mit Coomassie-Blau. In der ersten Spur ist jeweils ein Marker zur Beurteilung der Lauffront zu sehen. In den Spuren zwei bis fünf sind die Pelletfraktionen der Proben nach Inkubation von drei Stunden, sechs Stunden, neun Stunden und nach Inkubation über Nacht aufgetragen. Die Spuren sechs bis neun zeigen jeweils die Überstände nach Zentrifugation, die Reihenfolge der Probenauftragung entspricht hierbei der Reihenfolge in den Spuren zwei bis fünf.

Ergebnisse

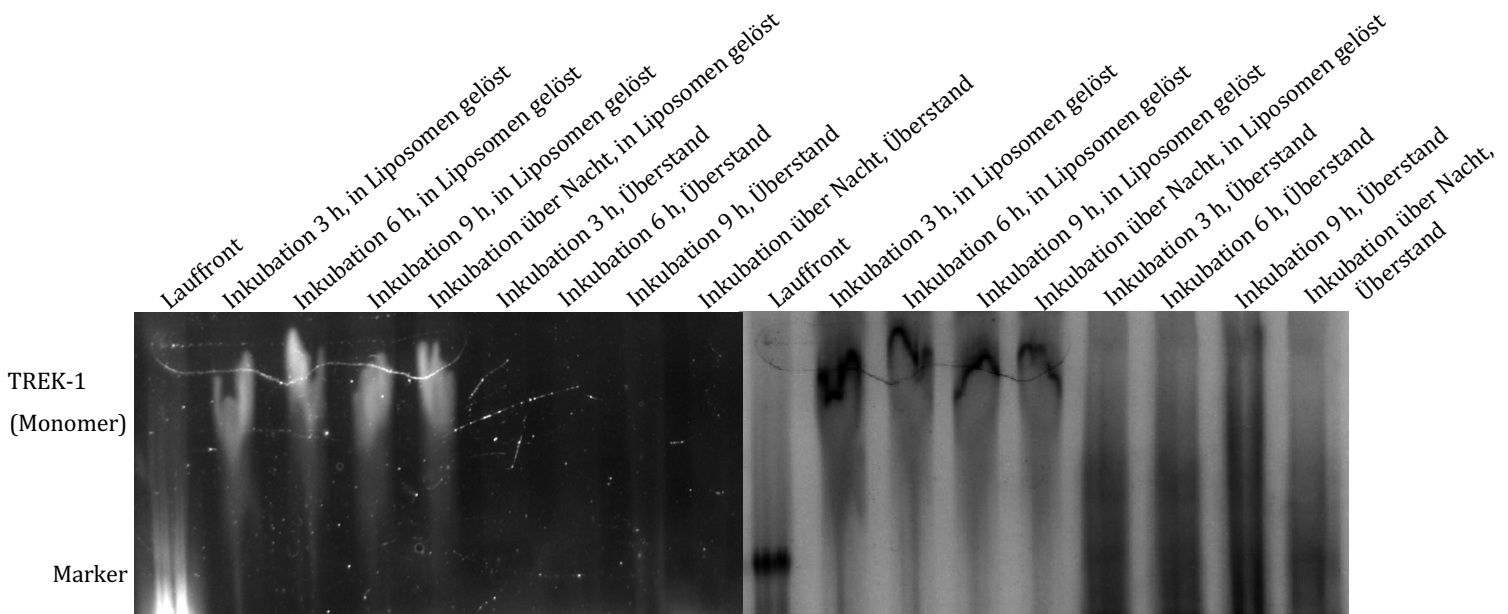


Abbildung 3.3 a) und b): Testung der optimalen Inkubationszeit der Translationsmischung des *in vitro* synthetisierten K2P-Kanals TREK-1. Darstellung durch SDS-PAGE. **a):** Fluoreszenzdetektion (Filtereinstellung „Pro Q Emerald 488“ mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System). **b):** Das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt (Filtereinstellung „Colorimetric“ mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System).

Wie Abbildung 3.3 a) und b) zeigen, sind deutliche Banden bei den Fraktionen der abzentrifugierten Liposomen vorhanden. Zu erwähnen ist, dass die Reaktionsmischung ungereinigt aufgetragen wurde. Dementsprechend bestand eine hohe Salzkonzentration und die SDS-Konzentration im Probenpuffer reichte nicht aus, um die enthaltenen SUV zu solubilisieren. Die K2P-Kanalproteine wurden deshalb nicht aus den verwendeten Liposomen extrahiert und die sichtbaren Banden sind folglich verzerrter, als dies in Gelelektrophoresen von reinem Protein der Fall ist.

In den Zentrifugationsüberständen hingegen ist keine klar abgrenzbare Bande sichtbar. Es lässt sich somit sagen, dass TREK-1 erfolgreich zellfrei synthetisiert wurde und dass die Ionenkanäle in den SUV abzentrifugiert werden konnten. Dies ließ sich insbesondere durch den Nachweis der Proteinbanden durch Fluoreszenz (Abb. 3.3 a)) belegen. Da der Kaliumkanal TREK-1 C-terminal mit GFP markiert war, konnten die Proteinbanden im Gel nur dann durch Fluoreszenz nachgewiesen werden, sofern Vollängenprotein entstanden war (vgl. Kapitel 2.6.1).

Ergebnisse

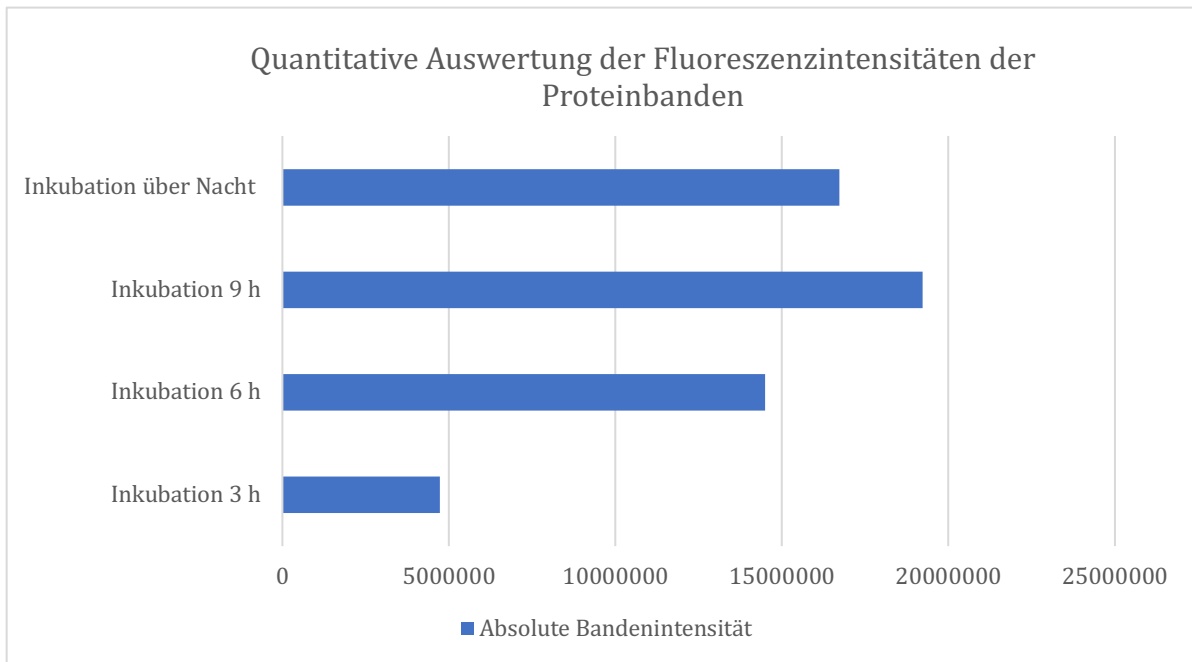


Abbildung 3.3 c): Quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten der Proteinbanden (Image Lab, Bio-Rad, München). Angabe in rohen Intensitätswerten. Ausgewertet wurden die Banden der jeweils in Liposomen gelösten Proben aus Abb. 3.3 a) (Spuren zwei bis fünf).

Abbildung 3.3 c) zeigt eine anschließend durchgeführte quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten der Proteinbanden. Die Auswertung erfolgte für die in Liposomen gelösten Proben, welche in Abbildung 3.3 a) als Banden in den Spuren zwei bis fünf sichtbar sind. Durch Bestimmung und Vergleich der Bandenintensitäten lässt sich sagen, dass nach längerer Inkubationszeit kein bedeutender Unterschied in der Proteinquantität festzustellen ist. Bei einer Inkubation über Nacht lässt sich ein leichter Rückgang der Fluoreszenzintensität beobachten, was möglicherweise auf eine Degradierung des K2P-Kanal-Proteins bei zu langer Inkubationsdauer hinweist. Für weitere Versuche kann deshalb davon ausgegangen werden, dass eine vergleichsweise kurze Inkubationsdauer von sechs Stunden bereits für eine ausreichend hohe Proteinausbeute genügt. In Folgeversuchen wurden die Translationsmischungen deshalb jeweils für sechs Stunden inkubiert.

3.3.2 Solubilisierungsversuche von TREK-2-Proteoliposomen mit verschiedenen Detergenzien

Die in dieser Arbeit erfolgreich zellfrei synthetisierten Kanäle sollten durch elektrophysiologische Methoden untersucht werden, um ihre Funktionalität zu bestätigen. Hierfür gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten zur Aufbereitung der Proben: Zum einen kann eine Zugabe von kanalhaltigen Proteoliposomen direkt nach Abzentrifugieren aus der Translationsmischung und Resuspendierung erfolgen. Alternativ besteht die Möglichkeit, die K2P-Kanal-Proteoliposomen zunächst mit Detergenzien zu solubilisieren, das Kanalprotein über den enthaltenen His-Tag zu reinigen und das daraus gereinigte Protein dann den elektrophysiologischen Untersuchungen zuzuführen. Die Auswahl des jeweiligen Detergenz und die Detergenzkonzentration können jedoch erheblichen Einfluss auf die Struktur und Funktionalität der zellfrei synthetisierten K2P-Kanäle haben. Es wurden deshalb verschiedene Detergenzien und Detergenzkonzentrationen getestet. Zur Bestimmung eines geeigneten Detergenz in angemessener Konzentration wurde der K2P-Kanal TREK-2 verwendet. Getestet wurden die Detergenzien DDM als verbreitetes nichtionisches Detergens zur Solubilisierung von Membranproteinen und SDC als anionisches Detergenz. Für beide Detergenzien wurden Konzentrationen von 1 % und 1,5 % untersucht.

In Abbildung 3.4 a) ist ein Gradientengel zu sehen, in dem die zellfrei synthetisierten Proteine im nativen Zustand aufgetragen wurden. Das bedeutet, dass die Proteine nicht denaturiert wurden. Dadurch sind sowohl die Monomere der K2P-Kanäle als auch die Dimere sichtbar (vgl. Kapitel 1.1). Die Spuren eins und zwei zeigen TREK-2 gelöst in 1 % und 1,5 % DDM. Die Spuren drei und vier zeigen TREK-2 gelöst in 1 % und 1,5 % SDC. Da TREK-2 einen GFP-Tag besaß, konnten die Banden durch In-Gel-Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Je heller die Bande, desto mehr Protein konnte solubilisiert werden und desto besser ist das jeweils eingesetzte Detergenz geeignet.

Ergebnisse

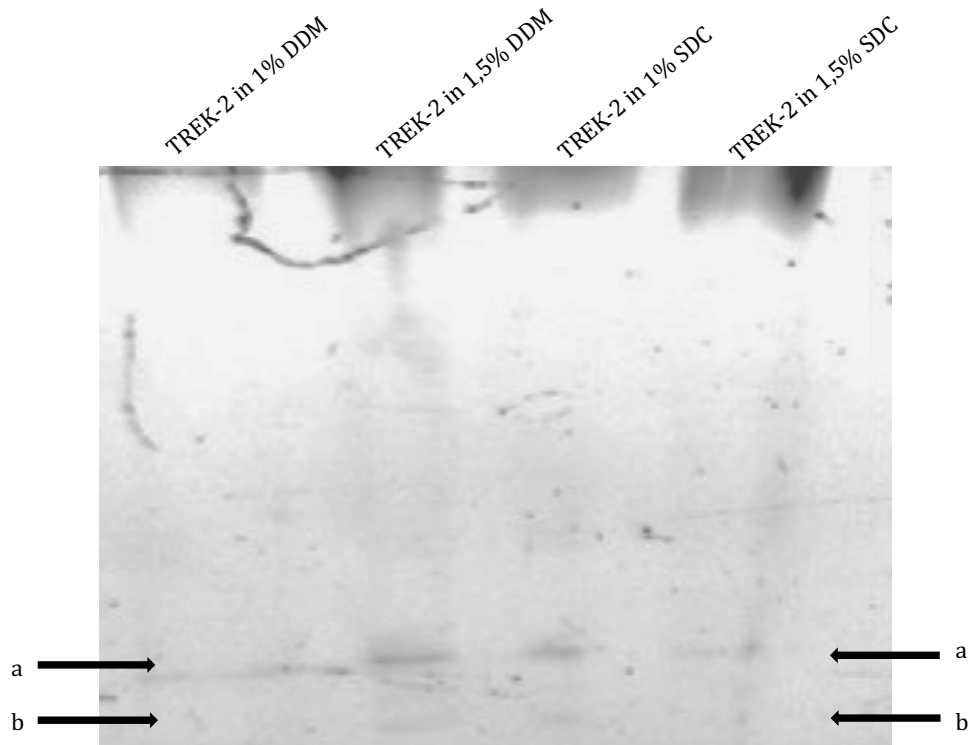


Abbildung 3.4 a): Bestimmung von geeigneten Detergenzien am Beispiel von TREK-2. Darstellung der Banden des zellfrei synthetisierten Ionenkanals im Gradientengel. Filtereinstellung „Pro Q Emerald 488“ mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System.

In allen Laufbahnen sind Banden erkennbar. Somit kann zunächst davon ausgegangen werden, dass der Kanal TREK-2 zellfrei hergestellt werden konnte. In einigen Ansätzen ist außerdem eine zweite, etwas höher gelegene Bande (a) sichtbar. Da in diesem Versuch ein natives Gel verwendet wurde und die Proteine somit nicht denaturiert wurden, lässt sich daraus schließen, dass es sich bei der höheren Bande um die Dimere der K2P-Kanäle handelt.

Ergebnisse

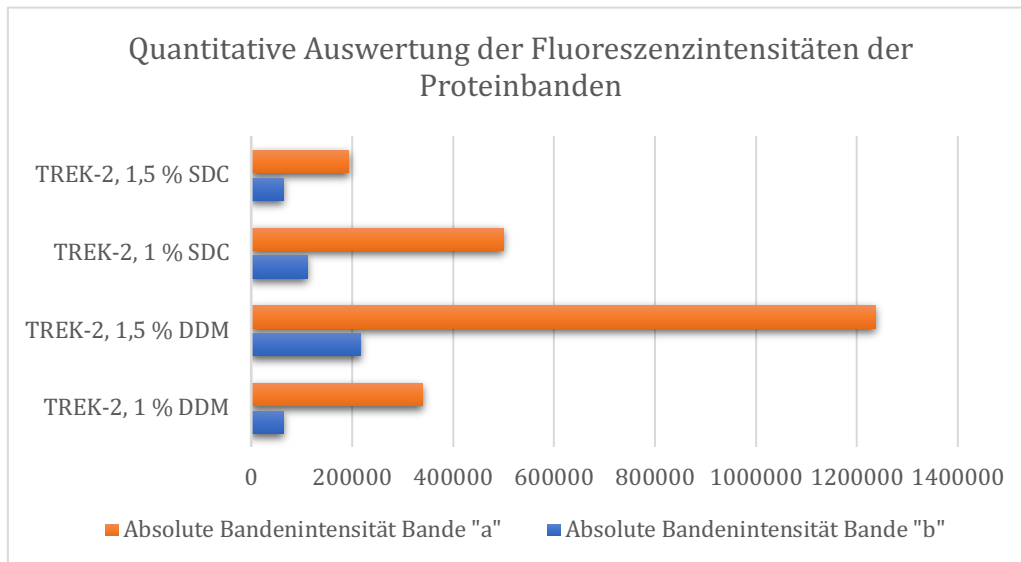


Abbildung 3.4 b): Quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten der Proteinbanden (Image Lab, Bio-Rad, München). Angabe in rohen Intensitätswerten. Ausgewertet wurden die Banden „a“ und „b“ der Spuren eins bis vier aus Abbildung 3.4 a).

Abbildung 3.4 b) zeigt eine anschließend durchgeführte quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten der Proteinbanden. Die Auswertung erfolgte für die Banden „a“ und „b“ aus Abbildung 3.4 a), welche dort in den Spuren eins bis vier sichtbar sind. Die Intensität der Proteinbanden ist, passend zur sichtbaren Fluoreszenz in Abb. 3.4 a), am höchsten in den Ansätzen, in denen eine Solubilisierung mit 1,5 % DDM und 1 % SDC erfolgte. Deshalb wurden diese Detergenzien für Folgeversuche in Betracht gezogen.

In Abbildung 3.4 a) zeigen sich am oberen Rand des Gels nahe der Geltaschen Bereiche hoher Fluoreszenzintensität. Dabei könnte es sich um nicht solubilierte Proteoliposomen handeln, die nicht in das Gel einlaufen konnten. Die Versuche mit DDM und SDC konnten somit nur einen Teil des TREK2-GFP-Proteins in Lösung bringen. Die Untersuchung der Solubilisierungsbedingungen bietet einen Ansatz für zukünftige Optimierungen.

3.3.3 In-vitro-Translation von TALK-2, TWIK-1, TRESK und THIK-1

Nach erfolgreicher in-vitro-Synthese von TREK-1 und TREK-2 wurden nun vier weitere der insgesamt fünfzehn K2P-Kanäle getestet. Bei den Kanälen handelt es sich um TALK-2, TWIK-1, TRESK und THIK-1.

Die erfolgreiche Synthese der Kanäle wurde zunächst durch eine SDS-PAGE bestätigt (Abbildung 3.5). Da die codierenden Sequenzen der getesteten K2P-Kanäle im Gegensatz zu den codierenden Sequenzen von TREK-1 und TREK-2 keinen GFP-Tag besaßen, konnte der Nachweis der erfolgreichen K2P-Kanalsynthese hier nicht durch eine Fluoreszenzdetektion erfolgen. Der Nachweis der Proteinbanden erfolgte deshalb sowohl hier als auch in den Folgeversuchen (Kapitel 3.3.4 und 3.3.5) durch eine Silberfärbung, welche sich durch ihre besonders hohe Sensitivität auszeichnet. Zudem erfolgte im genannten Zusammenhang das zusätzliche Auftragen einer Leerkontrolle mit Wasser anstatt RNS. Hierdurch konnte endogenes Weizenkeimprotein von den Proteinbanden der K2P-Kanäle unterschieden werden.

Abbildung 3.5 zeigt ein SDS-PAGE-Gel mit Proben der zellfreien Translationen von TALK-2, TWIK-1, TRESK und THIK-1. Spur eins zeigt dabei einen Marker zum Größenvergleich der Banden, Spur zwei und drei zeigen Pellet und Überstand der Leerkontrollen mit Wasser. Die Spuren vier bis fünf, sechs bis sieben, acht bis neun und zehn bis elf zeigen jeweils nebeneinander Pellet und Zentrifugationsüberstand nach der zellfreien Translation von TALK-2, TWIK-1, TRESK und THIK-1.

Ergebnisse

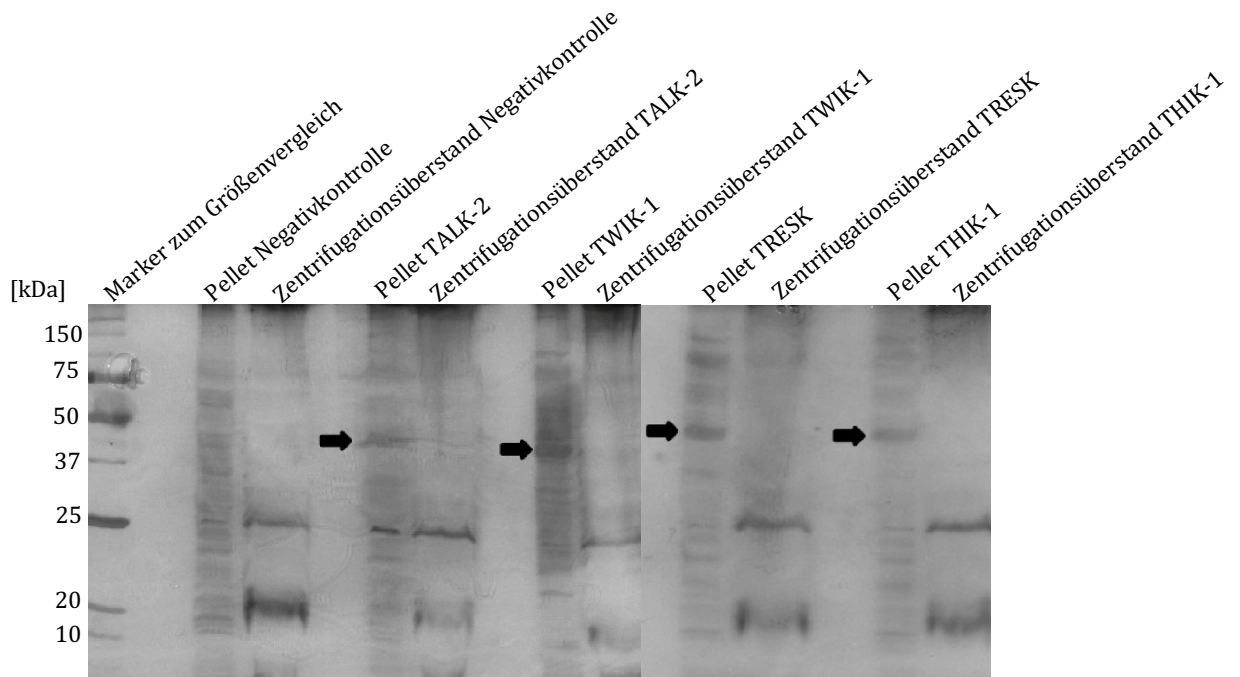


Abbildung 3.5: SDS-PAGE-Gel der zellfreien Synthese von TALK-2, TWIK-1, TRESK und THIK-1. Darstellung der Banden durch Silberfärbung. Filtereinstellung „Colorimetric“ mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System.

Im Vergleich zur Leerkontrolle fällt auf, dass bei allen vier Kanälen eine zusätzliche prominente Bande vorhanden ist. Hierbei handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die Monomere der getesteten K2P-Kanäle. Die Bandenhöhe der vermuteten Kanalmonomere wurde mit der bekannten molekularen Masse der K2P-Kanäle verglichen. Das Monomer von TALK-2 ist ca. 36,9 kDa groß, was mit der Bandenhöhe des vermutlichen Kanalmonomers übereinstimmt. Das Monomer von TWIK-1 ist ca. 38,1 kDa groß, womit Bandenhöhe und Monomergröße ebenfalls übereinstimmen. Bei TRESK (Monomergröße ca. 43,7 kDa) und THIK-1 (Monomergröße ca. 45,4 kDa) ist dies ebenfalls der Fall. Somit lässt sich schließen, dass alle vier Kanäle erfolgreich zellfrei synthetisiert wurden.

3.3.4 In-vitro-Translation von TRAAK, TALK-1 und KCNK7

Im Anschluss wurde getestet, ob die Kanäle TRAAK, TALK-1 und KCNK7 ebenfalls zellfrei synthetisierbar sind. Besonders interessant war hierbei die in-vitro-Translation von

Ergebnisse

KCNK7. Dieser Kanal exprimiert nicht in den für Ionenkanalmessungen herkömmlich verwendeten Oozyten von *Xenopus laevis*. Deshalb ist bisher nur wenig über den Kanal bekannt. Hoch interessant war es deshalb, ob der Kanal zellfrei synthetisierbar ist und ob die zellfreie Proteinsynthese somit zukünftig die Chance bietet, Analysen an diesem Kanal durchzuführen. Wie im vorherigen Versuch wurde eine erfolgreiche Synthese im SDS-PAGE-Gel analysiert. Da in den Vorversuchen (vgl. Kapitel 3.3.3) keine K2P-Kanalproteine in den Zentrifugationsüberständen detektierbar gewesen waren, wurden diese in den folgenden Experimenten nicht mit aufgetragen.

Abbildung 3.6 zeigt ein SDS-PAGE-Gel mit Proben der zellfreien Translationen von TRAAK in Spur drei, TALK-1 in Spur vier und KCNK7 in Spur fünf. Spur eins zeigt einen Marker zur Größenkontrolle, in Spur zwei ist eine Leerkontrolle aufgetragen.

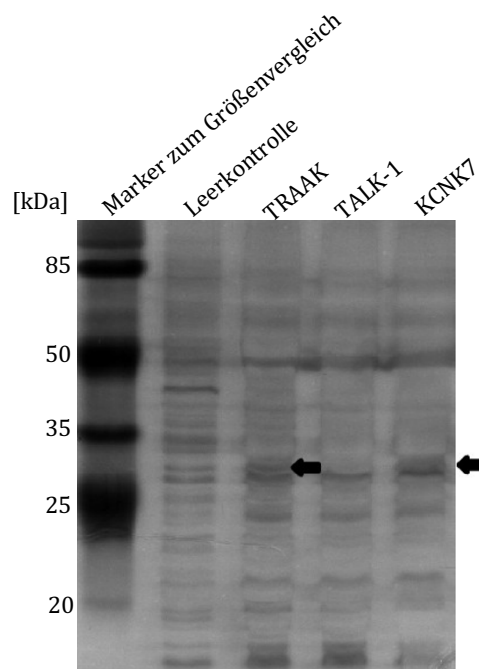


Abbildung 3.6: SDS-PAGE-Gel der zellfreien Synthese von TRAAK, TALK-1 und KCNK7. Darstellung durch Silberfärbung. Filtereinstellung „Colorimetric“ mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System.

Im Vergleich zur Leerkontrolle ist eine deutliche zusätzliche Bande beim Syntheseansatz von KCNK7 zu sehen. Diese Bande befindet sich im Bereich zwischen 25 und 35 kDa und stimmt von der Lokalisation her mit der molekularen Masse des Monomers überein (Monomer ca. 31,9 kDa). Daraus lässt sich schließen, dass KCNK7 erfolgreich zellfrei synthetisiert wurde. In etwa gleicher Höhe ist auch eine zusätzlich zur Leerkontrolle vorhandene Bande bei TRAAK sichtbar. Diese Bande weist allerdings eine eher schwache

Ergebnisse

Intensität auf. Auch hier stimmt die Lokalisation mit der bekannten molekularen Masse des Kanalmonomers überein (Monomer ca. 42,7 kDa). Bei TALK-1 ist bei der erwarteten Höhe der Monomerlokalisierung (Monomergröße ca. 34,2 kDa) keine zusätzliche Bande sichtbar. Schlussfolgernd lässt sich zunächst sagen, dass der K2P-Kanal KCNK7 zellfrei synthetisiert wurde.

Da aus den geringen Bandenintensitäten für TRAAK und TALK-1 in der SDS-PAGE nicht sicher abzuleiten war, ob Kanalprotein zellfrei synthetisiert wurde, wurde ein Western Blot durchgeführt. Die kodierenden Sequenzen der K2P-Kanäle enthielten Anhänge, die zur Detektion durch Antikörper verwendet werden konnten.

Es wurde zunächst je eine neue Translationsprobe von TRAAK und TALK-1 angesetzt. Nach erneuter SDS-PAGE wurde ein Western Blot durchgeführt (Abbildung 3.7). Beide Sequenzen der K2P-Kanäle waren sowohl N-terminal mit einem His-Tag als auch C-terminal mit einem HA-Tag versehen. Somit war es möglich, die in-vitro-Synthese durch spezifische Antikörper gegen diese Proteinmarkierungssequenzen darzustellen.

Abbildung 3.7 zeigt eine Western-Blot-Analyse der zellfreien Synthese von TRAAK und TALK-1. Spur eins zeigt einen Marker als Größenvergleich, Spur zwei und drei zeigen Proben der zellfreien Translation von TRAAK und TALK-1 nach Western Blot unter Verwendung eines His-Antikörpers. Spur vier und fünf zeigen Proben der zellfreien Translation von TRAAK und TALK-1 nach Western Blot unter Verwendung eines HA-Antikörpers.

Ergebnisse

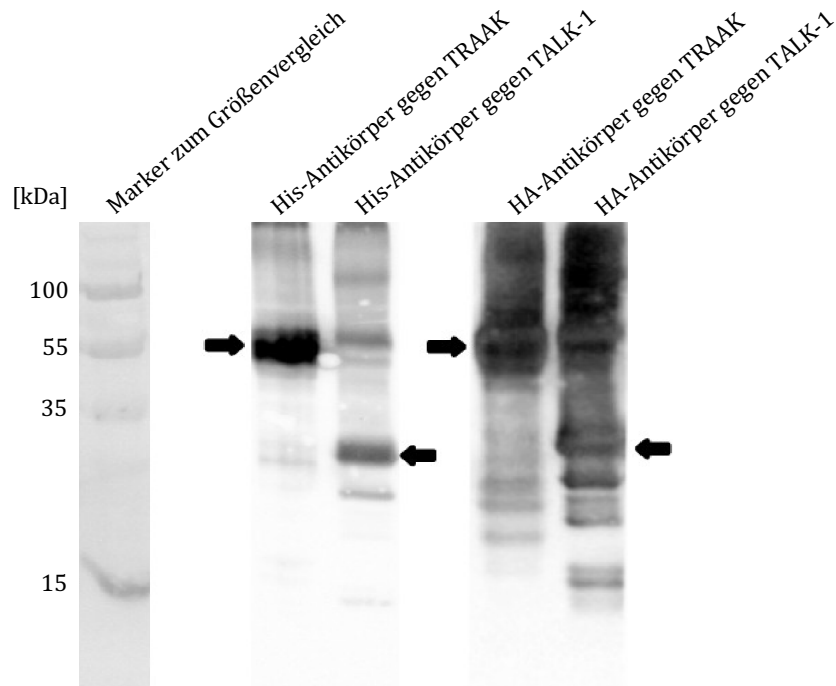


Abbildung 3.7: Western-Blot-Analyse der zellfreien Synthese von TRAAK und TALK-1. Filtereinstellung „Colorimetric“ (Darstellung des Markers) und „Chemi“ (Darstellung der Proteinbanden) mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System.

Bei TRAAK ist bei beiden applizierten Antikörpern eine intensive Bande in etwa der erwarteten Höhe zu erkennen. Bei TALK-1 ist ebenfalls bei beiden applizierten Antikörpern eine prominente Bande im erwarteten Bereich zu erkennen. Im Vergleich mit den bekannten molekularen Massen kann somit davon ausgegangen werden, dass beide Kanäle erfolgreich zellfrei synthetisiert wurden.

Generell lässt sich sagen, dass beide Kanäle im Vergleich zu den anderen K2P-Kanälen in geringerer Proteinkonzentration synthetisiert wurden. Weiterhin weicht die Bandenhöhe leicht von der erwarteten Lage ab. Dies ist dadurch bedingt, dass es sich bei K2P-Kanälen um Membranproteine handelt, deren transmembranäre Anteile hydrophob sind, während der als Größenvergleich aufgetragene Marker ein zytosolisches bzw. lösliches Protein ist. Deshalb besteht nur eine indirekte Vergleichbarkeit, da der hydrodynamische Radius durch einen unterschiedlichen Denaturierungsgrad und durch eine unterschiedlich starke SDS-Bindung der verschiedenen Proteine beeinflusst wird. Des Weiteren sind in Abbildung 3.7 bei beiden K2P-Kanälen mehrere Banden bei höheren und niedrigeren Molekulargewichten zu sehen. Hierbei könnte es sich um Proteinfragmente handeln, die zum Teil durch vorzeitiges Abdissoziieren der Ribosomen von der RNS während der

Ergebnisse

Translation entstehen. Da diese Fragmente ebenfalls die His- und/oder HA-Anhänge besitzen, werden diese Fragmente ebenfalls detektiert. Außerdem war die Konzentration des verwendeten HA-Antikörpers etwas zu hoch, was möglicherweise zur Detektion unspezifischer Banden geführt hat.

3.3.5 In-vitro-Translation von TASK-1, TASK-2 und TASK-3

Zuletzt wurde untersucht, ob sich die K2P-Kanäle TASK-1, TASK-2 und TASK-3 zellfrei synthetisieren lassen. Zunächst wurde eine SDS-Page-Analyse durchgeführt (Abbildung 3.8). Zu sehen ist in Spur eins ein Marker zum Größenvergleich, Spur zwei und drei zeigen Pellet und Zentrifugationsüberstand nach zellfreier Translation von TASK-1. Spur vier und fünf zeigen Pellet und Zentrifugationsüberstand nach zellfreier Translation von TASK-2. Spur sechs und sieben zeigen schließlich Pellet und Zentrifugationsüberstand nach zellfreier Translation von TASK-3.

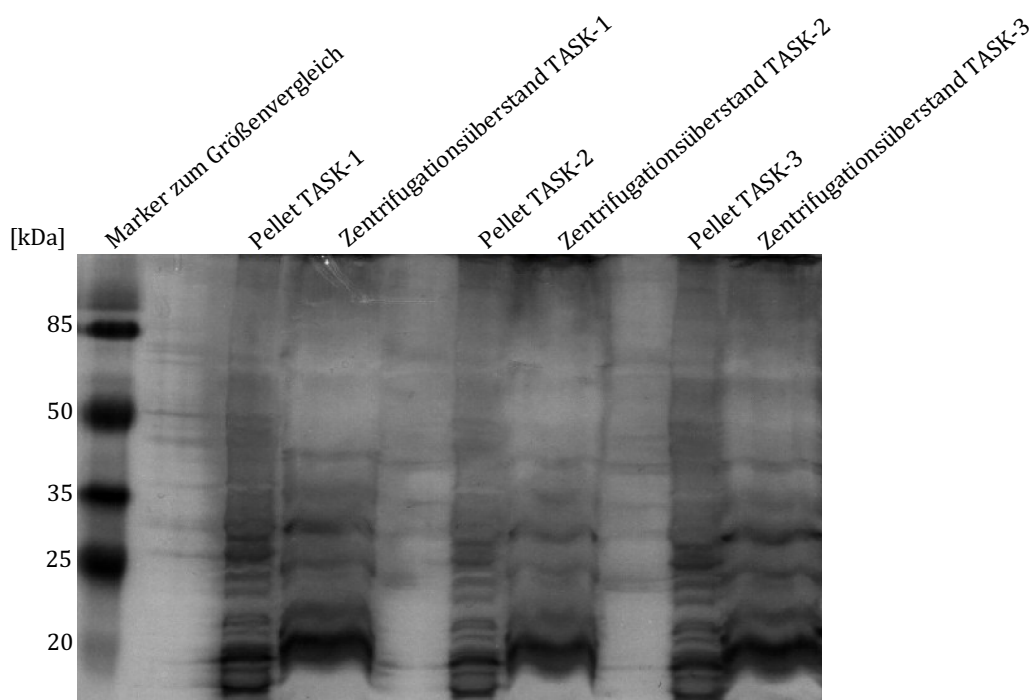


Abbildung 3.8: SDS-PAGE-Gel der zellfreien Synthese von TASK-1, TASK-2 und TASK-3. Darstellung durch Silberfärbung. Filtereinstellung „Colorimetric“ mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System.

Ergebnisse

Es wurde erneut mit einer Negativkontrolle verglichen. Bei keinem der getesteten Kanäle war eine zusätzliche Bande in erwarteter Höhe sichtbar. Deshalb wurde im Anschluss erneut eine Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen die auch bei diesen Kanälen vorhandenen His- und HA-Anhänge durchgeführt (Abbildung 3.9).

Zu sehen ist in Spur eins ein Marker zum Größenvergleich. In den Spuren zwei bis vier sind die zellfrei hergestellten Translationsprodukte von TASK-1, TASK-2 und TASK-3 nach Hinzugabe eines His-Antikörpers dargestellt. Die Spuren fünf bis sieben zeigen die zellfrei hergestellten Translationsprodukte von TASK-1, TASK-2 und TASK-3 nach Hinzugabe eines HA-Antikörpers.

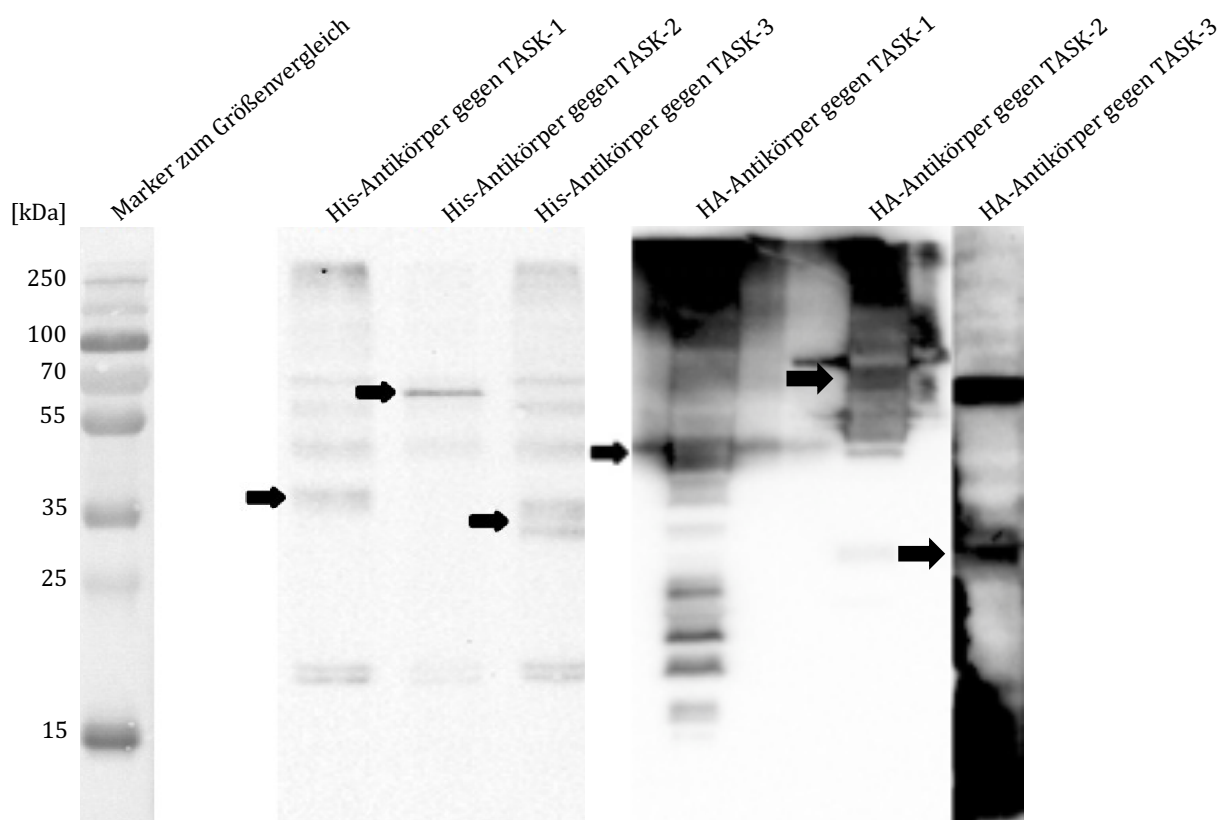


Abbildung 3.9: Western-Blot-Analyse der zellfreien Synthese von TASK-1, TASK-2 und TASK-3. Filtereinstellung „Colorimetric“ (Darstellung des Markers) und „Chemi“ (Darstellung der Proteinbanden) mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System.

Zunächst wurde die Bandendetektion durch den His-Antikörper betrachtet. Es fällt auf, dass bei TASK-1 und TASK-3 mehrere Banden erkennbar sind. Bei den niedermolekularen Banden handelt es sich möglicherweise wiederum um Proteinfragmente, die durch

Ergebnisse

vorzeitiges Abdissoziieren der Ribosomen von der RNS während der Translation entstehen. Das TASK-1-Monomer ist ca. 43,5 kDa groß, im Bereich dieser Höhe ist auf der Membran eine deutliche Bande sichtbar. Das TASK-3-Monomer hat eine Größe von ca. 42,3 kDa, auch hier sind zusätzliche Banden sichtbar. Bei dem Kanal TASK-2 sind ebenfalls mehrere Banden sichtbar. Zusätzlich ist hier eine intensive Bande im Bereich zwischen 55 und 70 kDa zu erkennen. Da das Monomer ca. 55,1 kDa groß ist, lässt sich vermuten, dass es sich bei der Bande um das Monomer von TASK-2 handeln könnte. Betrachtet man die Bandendetektion durch den HA-Antikörper, ist zu sehen, dass die gleichen Banden, welche zuvor bereits mit dem His-Antikörper detektiert wurden, sichtbar sind. Die Bande, die bei TASK-3 detektiert wurde, ist jedoch recht stark geschwärzt und nicht sicher abgrenzbar.

Es lässt sich somit aus dieser Analyse schlussfolgern, dass sich TASK-1 und TASK-2 vermutlich zellfrei herstellen lassen. Das TASK-3-Monomer wurde zwar durch den His-Antikörper detektiert, bei der Detektion durch den HA-Antikörper ist es aufgrund der stärkeren Schwärzung jedoch fraglich, ob es sich um eine Proteinbande handelt. Deshalb ist es fraglich, ob TASK-3 in voller Länge synthetisiert wurde.

3.4 Messungen der K2P-Ionenkanalströme am Port-a-Patch

3.4.1 Herstellung von „giant unilamellar vesicles“ (GUV)

Die vielversprechenden Kandidaten, für die nach der zellfreien Synthese die Entstehung von Protein gezeigt wurde, sollten nun durch elektrophysiologische Methoden auf ihre Funktionalität überprüft werden. Dazu wurde das Port-a-Patch-System mit planaren künstlichen Membranen verwendet. Diese lösungsmittelfreien Membranen entstehen durch das Ansaugen sogenannter GUV. GUV sind im Vergleich zu den unter Kapitel 3.2 beschriebenen SUV größere unilamellare Vesikel und bieten den Ionenkanälen ein membranähnliches Milieu zum Insertieren.

Ergebnisse

Um einen Bilayer für die Messungen am Port-a-Patch zu generieren, wurden vorbereitend zunächst GUV mit dem Vesicle Prep Pro hergestellt (vgl. 2.8.1). Nach der Synthese wurde die Größe der synthetisierten Lipidvesikel mikroskopisch kontrolliert (Abb. 3.10).

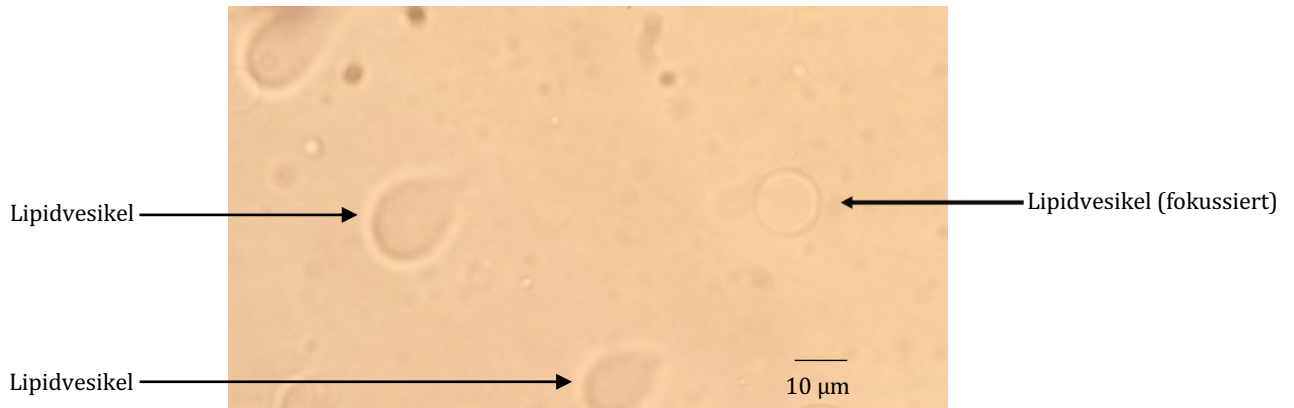


Abbildung 3.10: Darstellung der GUV unter dem Lichtmikroskop.

Insgesamt lässt sich sagen, dass mit Hilfe des Vesicle Prep Pro erfolgreich GUV synthetisiert werden konnten, welche sich für Messungen am Port-a-Patch eignen. In Abbildung 3.10 sind einige GUV leicht verformt. Dies ist dadurch bedingt, dass die GUV dem Rand des Tropfens unter dem Mikroskop zustreben, sofern sie (wie hier) ohne flüssigkeitsgefüllte Kammer betrachtet werden.

3.4.2 Elektrophysiologische Messungen von TREK-2-Einzelkanälen am Port-a-Patch

Da der Kanal TREK-2 einer der am besten charakterisierten Kanäle der K2P-Kanalfamilie ist und viele Aktivatoren und Inhibitoren des Kanals bekannt sind, wurde dieser Kanal zur Prüfung der Ionenkanalfunktionalität verwendet.

Es wurden mehrere Messreihen durchgeführt, in denen Kanalaktivitäten beobachtet werden konnten.

Bei den Messungen wurden verschiedene Kaliumkonzentrationen verwendet. Es wurde jeweils bei einer Spannung von 0 mV gemessen, da bei Anlegen einer Spannung eine

Ergebnisse

Bilayerinstabilität wahrzunehmen war. Aufgrund der folgend verwendeten Konzentrationsgradienten war trotz der fehlenden Spannung eine ausreichende Triebkraft vorhanden, sodass Kanalöffnungen sichtbar wurden.

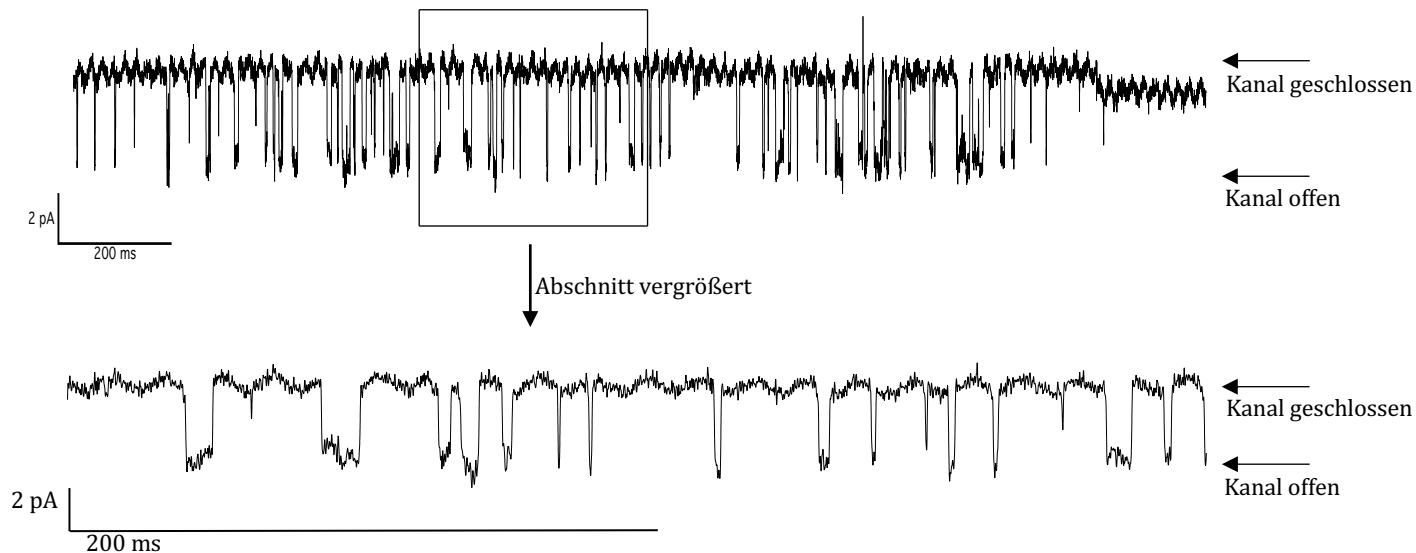


Abbildung 3.11 a): Darstellung von TREK-2-Ionenkanalströmen. In der unteren Abbildung Vergrößerung des rechteckig markierten Bereichs. Messung in einer asymmetrischen Kaliumlösung (500 mM und 2 mM intra-/extrazellulär), Haltepotenzial 0 mV.

Abbildung 3.11 a) zeigt regelmäßige Kanalaktivitäten von TREK-2 bei einer Messung in 500 mM und 2 mM Kalium intra- und extrazellulär und einem Haltepotenzial von 0 mV. Erwähnenswert ist, dass sich aufgrund von Hintergrund-Störsignalen ein „Brummen“, sichtbar als periodisch schwankende Baseline, zeigt.

Die Stromamplitude der TREK-2 Kanalöffnungen lag bei 4 pA +/- 2 pA. Der Kanal befand sich circa 75 % der Zeit, in der er sichtbar war, im geschlossenen Zustand. Die Öffnungsdauer lag zwischen 1 ms und 12 ms.

Da das elektrochemische Potential für diesen Kaliumgradienten für einen korrekt orientierten Kanal in der Zellmembran einen Kaliumauswärtsstrom erwarten lässt, muss der hier sichtbare Kanal in „inside-out“-Orientierung insertiert haben (negative Amplituden bedeuten Kaliumeinwärtsstrom). Dies ist möglich, da bei Applikation der kanalhaltigen Proteoliposomen auf den Bilayer nicht beeinflussbar ist, in welche Richtung die K2P-Kanäle im Bilayer insertieren. Somit sind folglich Kanalöffnungen in beide

Ergebnisse

Richtungen möglich, je nachdem, ob der Kanal mit seiner extrazellulären Seite entsprechend der Extrazellulärlösung („outside-out“-Orientierung) oder entgegengesetzt insertierte („inside-out“-Orientierung).

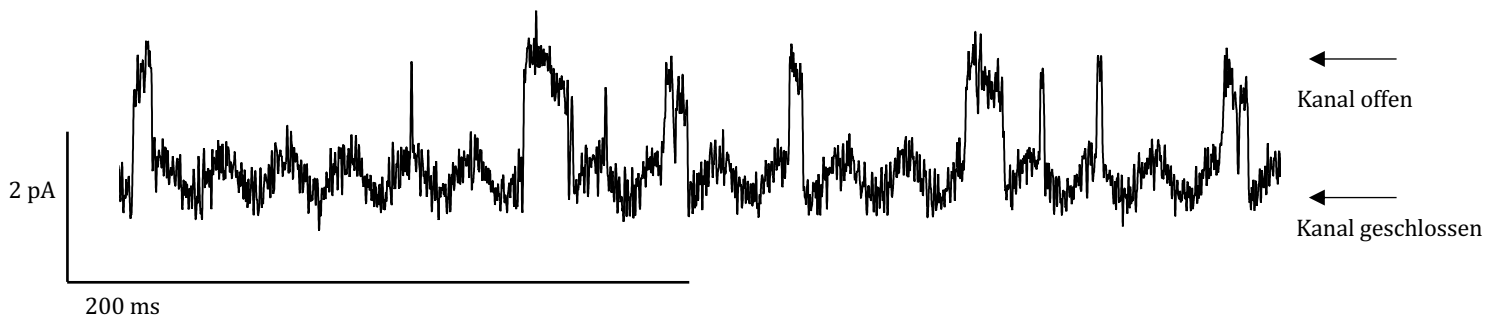


Abbildung 3.11 b): Darstellung von TREK-2-Ionenkanalströmen. Messung in einer asymmetrischen Kaliumlösung (125 mM und 4 mM intra-/extrazellulär), Haltepotenzial 0 mV.

Abbildung 3.11 b) zeigt eine regelmäßige Kanalaktivität von TREK-2 bei einer Messung in 125 mM und 4 mM Kalium intra- und extrazellulär und einem Haltepotenzial von 0 mV. Zu sehen sind Kanalaktivitäten mit einer Amplitude von $1,5 \text{ pA} \pm 0,5 \text{ pA}$ mit einer Kanalöffnung in Auswärtsrichtung, entgegengesetzt zu Abbildung 3.11 a). Die Kanalöffnungsdauer lag zwischen 1 ms und 15 ms. Zudem ist erneut das bereits bei Abbildung 3.11 a) beschriebene Hintergrund-Störsignal zu sehen.

Die in Abb. 3.11 a) beobachteten Einzelkanalströme haben bei 500 mM und 2 mM Kalium intra-/extrazellulär eine Amplitude von $4 \pm 2 \text{ pA}$. Dies entspricht einem Leitwert von $28,7 \pm 14,3 \text{ pS}$. Die beobachteten Einzelkanalströme in Abb. 3.11 b) haben bei 125 mM und 4 mM Kalium intra-/extrazellulär eine Amplitude von $1,5 \pm 0,5 \text{ pA}$. Dies entspricht Leitwerten von $17,3 \pm 5,75 \text{ pS}$.

Insgesamt gestalteten sich die Ionenkanalfunktionsmessungen mit dem Port-a-Patch jedoch schwierig. Kritischer Faktor war hierbei die Instabilität der künstlichen Membranen. In den meisten Fällen der Messungen brachen die Membranen vorzeitig auf und es konnte keine Ionenkanalaktivität gemessen werden. Auch in den Fällen, in denen eine Ionenkanalaktivität sichtbar wurde, brachen die Membranen im Verlauf der Messungen recht zügig auf.

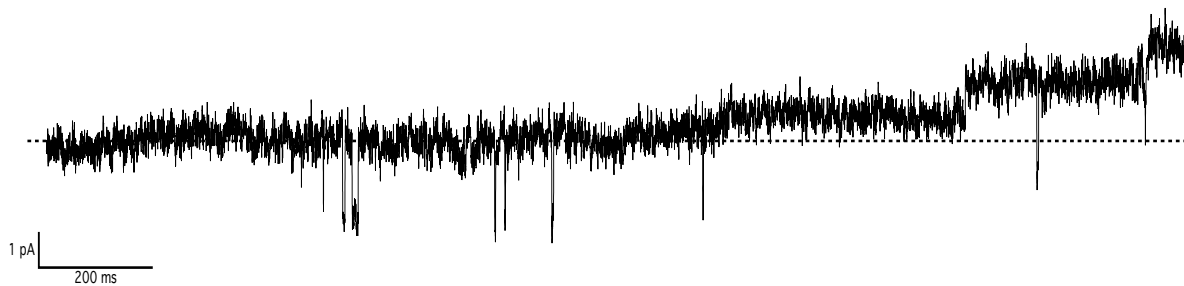


Abb. 3.11 c): Darstellung eines instabilen Bilayers bei einer Messung am Port-a-Patch.

Solch eine genannte Instabilität des Bilayers ist beispielhaft in Abbildung 3.11 c) zu sehen. Es ist eine Baseline zu sehen, welche nach Zugabe der Reaktionslösung zwar Kanalöffnungen, im Verlauf jedoch auch eine Höhenverschiebung der Baseline zeigt. Durch die Instabilität konnten beispielsweise keine TREK-2-Kanal-Aktivatoren oder TREK-2-Kanal-Inhibitoren appliziert werden, um auszuschließen, dass es sich bei den sichtbaren Kanalöffnungen um endogene Weizenkeimproteinkanäle handelt. Zukünftig ist es daher nötig, die Bilayerstabilität zu optimieren, um praktikable Messreihen zu generieren. In dieser Arbeit wurden aufgrund der beschriebenen Problematik deshalb weitere Messungen am Orbit Mini durchgeführt (vgl. Kapitel 3.5).

3.5 Messungen der K2P-Ionenkanalströme am Orbit Mini

Mit dem Orbit Mini lassen sich ebenfalls Messungen von Ionenkanalströmen durchführen. Durch vier Mikrokavitäten auf einem Chip sind gleichzeitig vier Bilayermessungen möglich. Für Messungen am Orbit Mini ist keine GUV-Synthese nötig. Es lässt sich durch direktes Auftragen von in Oktan gelöstem Lipid ein Bilayer erzeugen (vgl. Kapitel 2.9). Die Erzeugung von stabilen Bilayern erwies sich im Vergleich zum Port-a-Patch unter anderem deshalb als wesentlich einfacher. Für die Messungen von Ionenkanalströmen am Orbit Mini wurde ebenfalls der K2P-Kanal TREK-2 verwendet. Da die Applikation der Messlösungen nur von einer Seite möglich war (vgl. Abbildung 2.5), konnte mit diesem System nur in einer symmetrischen Messlösung gemessen werden. Dafür zeigten sich bei den Messungen mit dem Orbit mini, wie bereits erwähnt, jedoch insgesamt stabilere Bilayer, sodass das Anlegen einer Spannung möglich war.

Ergebnisse

In diesem Messsystem konnte die Funktionsfähigkeit des zellfrei synthetisierten Kanals TREK-2 bestätigt werden. Weiterhin sollte durch Zugabe des TREK-2-Aktivators BL 1249 gezeigt werden, dass es sich bei den sichtbaren Kanalöffnungen nicht um endogenes Weizenkeimprotein, sondern um die Aktivität des K2P-Kanals handelt.

Abbildung 3.12 zeigt die Ionenkanalaktivität von TREK-2 nach Applikation des TREK-2-Aktivators BL 1249 (0,8 mM).

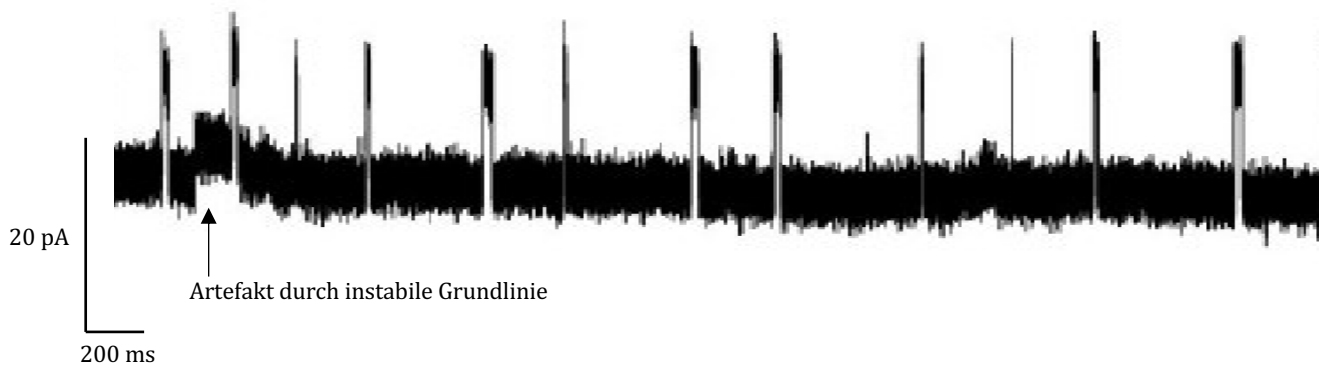


Abbildung 3.12: Darstellung von TREK-2-Ionenkanalströmen. Messung bei einer Kaliumkonzentration von symmetrisch 200 mM und einem Haltepotenzial von -80 mV.

Zunächst zeigte sich ein stabiler Bilayer ohne Kanalaktivitäten (hier nicht dargestellt). Nach Hinzugabe des TREK-2-Kanal-Aktivators BL 1249 konnte Kanalaktivität beobachtet werden. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass durch die Wirkung von BL 1249 der zunächst ruhende Kanal TREK-2 aktiviert werden konnte. Die Öffnung des Kanals in Auswärtsrichtung bei einem Haltepotenzial von -80 mV lässt sich dadurch erklären, dass der Kanal zufällig in „inside-out“-Orientierung insertiert hat, denn der elektrochemische Gradient würde bei korrekter Orientierung des Kanals für einen Kaliumeinwärtsstrom sorgen. Die Amplitude betrug 20 pA +/- 1 pA, während sich die Öffnungsdauer im Bereich von 10 bis 15 ms befand.

Insgesamt lässt sich durch die sichtbaren Ionenkanalöffnungen sagen, dass der K2P-Kanal TREK-2 ebenfalls in der lösungsmittelhaltigen Membran des Orbit Mini funktionsfähig ist. Weiterhin konnte durch die Aktivierung nach Hinzugabe des TREK-2-Kanal-Aktivators BL 1249 gezeigt werden, dass die Aktivität nicht auf eine Kontamination durch

Ergebnisse

Weizenkeimkanäle zurückzuführen ist, sondern dass es sich um eine Aktivität des Kanals TREK-2 handelt.

3.6 Zusammenfassung

Abschließend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit die zellfreie Synthese von elf der insgesamt fünfzehn K2P-Kanäle gezeigt werden konnte. Die Reaktionsbedingungen konnten durch die Herstellung und Nutzung von Proteoliposomen und Detergenzien verbessert werden, um abschließend Messungen durchzuführen, welche die Funktionalität der Ionenkanäle beweisen sollten. Anhand des K2P-Kanals TREK-2 konnte schließlich die Funktionalität der zellfrei synthetisierten Kanäle beispielhaft gezeigt werden. Durch die Applikation von spezifischen Aktivatoren des Kanals konnte zudem ausgeschlossen werden, dass es sich bei den sichtbaren Kanalaktivitäten um endogene Weizenkeimkanäle handelt.

4. Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Möglichkeit der zellfreien Expression systematisch für die Familie der K2P-Kanäle untersucht werden. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass sich alle zwölf getesteten K2P-Kanäle zellfrei transkribieren lassen. Für acht der zwölf verfügbaren K2P-Kanäle konnte die zellfreie Synthese von K2P-Kanal-Protein im korrekten Molekulargewichtsbereich festgestellt werden. Für drei K2P-Kanäle konnte ein Nachweis durch die Detektion von Anhängen im Western Blot gezeigt werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die K2P-Kanäle in liposomale Umgebungen in Form der SUV und GUV insertieren konnten. Es konnte schließlich am Beispiel von TREK-2 mit elektrophysiologischen Methoden gezeigt werden, dass die in vitro hergestellten Kanäle funktionell sind.

4.1 Zellfreie Synthese der K2P-Kanäle in Anwesenheit von Liposomen

4.1.1 In-vitro-Transkription und RNS-Nachweis

Zunächst musste RNS für die Synthese der Ionenkanäle bereitgestellt werden.

Von allen zwölf getesteten K2P-Kanälen konnte die RNS erfolgreich in vitro synthetisiert werden (vgl. Kapitel 3.1). Durch den Integritätsnachweis der RNS im Agarosegel konnte diese Annahme unterstützt werden (vgl. Abbildungen 3.1).

Eine besondere Herausforderung der in-vitro-Transkription stellte die mögliche Kontamination der Proben mit RNasen dar.

In dieser Arbeit konnten mehrmals Kontaminationen der Proben mit RNasen beobachtet werden: Die in vitro synthetisierte RNS konnte dann nicht weiter für die in-vitro-Translation verwendet werden (vgl. Abbildung 3.2). Die durch RNase abgebauten Ribonukleinsäuren waren im Agarosegel an der im Vergleich zu intakter RNS deutlich geringeren Anzahl der Basenpaare zu erkennen. Sie migrierten dadurch weiter im

Agarosegel, da kleinere RNS-Fragmente besser durch die Gelporen wandern können. Durch Austausch des kontaminierten Reaktionsmaterials und durch besondere Vorsicht beim RNase-freien Arbeiten ließ sich die RNase-Kontamination der Proben vermeiden.

In zahlreichen Protokollen ist beschrieben, dass die Qualität der DNS einer der wichtigsten Einflussfaktoren auf eine erfolgreiche in-vitro-Transkription ist. Durch Verwendung eines z.B. ungeeigneten Plasmid-Präparationskits, welches die bei der Lyse eingesetzte RNase anschließend nicht ausreichend entfernt, kann die Qualität der DNS zu minderwertig für eine in-vitro-Transkription sein (Struhl, 2001). Die in der Arbeit verwendete DNS wurde deshalb durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolfällung gereinigt (Kapitel 2.2.2).

4.1.2 Herstellung und Verwendung der SUV

Eine Aggregation und Präzipitation von Proteinen während der zellfreien Synthese führt zum Funktionsverlust. Dadurch wird die Ausbeute an funktionellem und richtig gefaltetem Protein erheblich vermindert. Die Menge an intaktem Protein reicht dann möglicherweise nicht für weitere Analysen, wie z.B. den in dieser Arbeit erfolgten elektrophysiologischen Messungen der K2P-Ionenkanalströme, aus. Um die Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein zu optimieren, wurden in dieser Arbeit die sogenannten SUV hergestellt. Der Zusatz dieser präformierten Liposomen zur zellfreien Translationsmischung war ausreichend, um die synthetisierten K2P-Kanäle in den SUV zu erhalten und ihre Funktionalität in elektrophysiologischen Untersuchungen nachzuweisen. Dieser Mechanismus wurde bereits für diverse andere Membranproteine in zellfreien Systemen beschrieben (Sachse et al., 2014).

4.1.3 Zellfreie Translation

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, ob sich die K2P-Kanäle zellfrei exprimieren lassen. Nachdem bereits gezeigt wurde, dass sich die RNS erfolgreich *in vitro* synthetisieren lässt, sollte nun die zellfreie Translation und somit die Synthese der Ionenkanäle untersucht werden.

Ob ein Expressionssystem für eine *in-vitro*-Proteinsynthese nutzbar ist, ist vom jeweiligen Protein abhängig. Aus Vorversuchen der Arbeitsgruppe war bekannt, dass sich die K2P-Kanäle nicht mit dem häufig verwendeten *E.-coli*-Extrakt *in vitro* synthetisieren lassen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich der eukaryotische Weizenkeimextrakt für eine *in-vitro*-Synthese der K2P-Ionenkanäle eignet. Die zellfreie Expression mit Hilfe von Weizenkeimextrakten wurde bereits für verschiedene Proteine beschrieben, wie beispielsweise für Proteine des *Plasmodium-falciparum*-Genoms (Kanoi et al., 2017), für die Prionenproteine Ure2p und HET-s (Noirot et al., 2011), für einen humanen Stearoyl-CoA-Desaturase-Komplex (Goren und Fox, 2008) und für eine Dihydrofolatreduktase (Endo et al., 1993). Eine zellfreie Expression von eukaryotischen Ionenkanälen mit Hilfe des Weizenkeimextraktes ist bisher noch wenig untersucht. Ein Beispiel für eine erfolgreiche Expression stellt hier der Kaliumkanal „Shaker“ dar (Jarecki et al., 2013).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die K2P-Kanäle TREK-1, TREK-2, TALK-2, TWIK-1, TRESK, THIK-1, TRAAK, TALK-1, KCNK7, TASK-1 und TASK-2 synthetisierbar sind. Der Nachweis von K2P-Kanalprotein erfolgte entweder anhand der Banden im korrekten Molekulargewichtsbereich (TREK-1, TREK-2, TALK-2, TWIK-1, TRESK, THIK-1, TRAAK, KCNK7) oder durch die Detektion von Anhängen im Western Blot (TALK-1, TASK-1, TASK-2). Eine zellfreie Synthese von humanen K2P-Kanälen in voller Länge ist bisher noch nie beschrieben worden. Aus Vorversuchen der Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass sich die K2P-Kanäle TREK-1 und TREK-2 zellfrei exprimieren lassen. Dies konnte in dieser Arbeit reproduziert und beispielsweise das TREK-2-GFP-Kanalprotein durch Fluoreszenz im Gel nachgewiesen werden. Für die anderen zuvor noch nie zellfrei exprimierten K2P-Kanäle wurde die erfolgreiche Synthese durch das Auftreten von Proteinbanden im SDS-Gel im Bereich der theoretisch zu erwartenden Molekulargewichts

Diskussion

belegt. Durch eine zum Vergleich aufgetragene Leerkontrolle konnte nachgewiesen werden, bei welchen Banden im Gel es sich um endogene Proteine des Weizenkeimextraktes handelte und welche Banden synthetisiertem Protein zugeschrieben werden konnten. Bei den K2P-Kanälen TALK-2, TWIK-1, TRESK, THIK-1 und KCNK7 war eine zusätzliche prominente Bande im jeweils erwarteten Größenbereich vorhanden. Die Erkenntnis, dass sich der K2P-Kanal KCNK7 *in vitro* synthetisieren lässt, ist von besonders großer Bedeutung: In der Literatur ist mehrfach beschrieben, dass dieser Kanal sich nicht in herkömmlichen Expressionssystemen synthetisieren lässt (Salinas et al., 1999; Yost et al., 2008). Somit konnte bisher nur wenig über Struktur und Funktion dieses K2P-Kanals beschrieben werden. Die zellfreie Proteinsynthese bietet somit eine vielversprechende Möglichkeit, den K2P-Kanal KCNK7 und andere schwer synthetisierbare Proteine zukünftig näher beschreiben zu können.

Beim K2P-Kanal TALK-1 konnte ebenfalls eine zusätzliche Bande im SDS-Gel gezeigt werden, diese war jedoch von vergleichsweise geringer Intensität. Deshalb wurde anschließend ein Western Blot durchgeführt. Hier konnte dann unter Zuhilfenahme von Antikörpern gegen die vorhandenen Proteinmarkierungssequenzen His und HA gezeigt werden, dass auch dieser K2P-Kanal zellfrei herstellbar ist. Bei den K2P-Kanälen TRAAK, TASK-1, TASK-2 und TASK-3 ließ sich im SDS-Gel keine zusätzliche Bande darstellen, welche dem bekannten Molekulargewicht entsprach. Aus diesem Grund wurde auch hier ein Western Blot durchgeführt. Durch eine erneute Applikation von Antikörpern gegen die Proteinmarkierungssequenzen His und HA konnte gezeigt werden, dass die Kanäle TRAAK, TASK-1 und TASK-2 zellfrei exprimierbar sind. Bei TASK-3 konnte zwar eine Bande unter Verwendung des His-Antikörpers dargestellt werden, unter Verwendung des HA-Antikörpers zeigte sich jedoch eine stark geschwächte Spur mit angedeuteter, aber dennoch nicht eindeutig identifizierbarer Bande. Die tatsächliche Synthese von TASK-3 konnte daher nicht sicher nachgewiesen werden. Die Banden der K2P-Kanäle TRAAK, TASK-1, TASK-2 und TASK-3 konnten nicht ebenso gut wie die Banden der anderen *in vitro* synthetisierten K2P-Kanäle im SDS-Gel sichtbar gemacht werden. Da die Banden der vier Kanäle im Anschluss jedoch im sensitiveren Western Blot sichtbar waren, lässt sich schließen, dass eine geringere Konzentration der zellfrei synthetisierten Kanäle vorgelegen hat. Für anschließende Analysen der K2P-Kanäle, wie beispielsweise

Diskussion

elektrophysiologische Untersuchungen, ist jedoch eine ausreichende Konzentration an Ionenkanalprotein essentiell. Die Reaktionsbedingungen sollten deshalb zukünftig für die genannten Kanäle modifiziert werden, um eine höhere Ausbeute an Protein zu erreichen. Für den Kanal TASK-3 gilt es, die in-vitro-Synthese in voller Länge noch zu beweisen.

Zur Detektion der Proteinmarkierungssequenzen His und HA durch Antikörper lässt sich sagen, dass die Methode zukünftig weiter optimiert werden sollte: Bei den K2P-Kanälen ließen sich im Western Blot mehrere Proteinbanden in verschiedenen Höhenbereichen erkennen. Banden, die bei geringeren Molekulargewichten erscheinen, sind durch Abbruchprodukte während der zellfreien Synthese erklärbar. Weitere Banden könnten von unspezifischer Detektion endogener Weizenkeimproteine durch die verwendeten Antikörper herrühren. Dies könnte durch eine zu lange Inkubation mit den Antikörpern oder eine zu hohe Antikörperkonzentration bedingt sein. In solchen Fällen adsorbieren auch die anderen Banden in geringerer Menge unspezifisch beide Antikörper (Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics, 6. Auflage, 2010). Besonders die Proben, bei denen der HA-Antikörper aufgetragen wurde, zeigten eine starke Schwärzung. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Antikörper zu hoch konzentriert verwendet wurde. Da die zellfreie Expression jedoch bereits für viele der K2P-Kanäle bestätigt werden konnte, war die Optimierung des Western-Blot-Nachweises nicht Inhalt dieser Arbeit.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass insgesamt elf der zwölf getesteten Kanäle der K2P-Familie in vitro synthetisierbar sind, wobei die Kanäle TALK-1, TRAAK, TASK-1 und TASK-2 in eher geringer Konzentration exprimiert wurden. Beim Kanal TASK-3 muss die zellfreie Expression in voller Länge noch bewiesen werden. Drei Kanäle (THIK-2, TASK5, TWIK-2) wurden aufgrund nicht verfügbarer DNS nicht in vitro synthetisiert. Da die zellfreie Synthese in dieser Arbeit jedoch für eine große Zahl der K2P-Kanäle gelungen ist, ist dieses Ergebnis möglicherweise auch auf THIK-2, TASK-5 und TWIK-2 übertragbar und stellt die Basis für lohnenswerte zukünftige Experimente mit diesen drei Kanälen dar.

4.2 Versuche zur Optimierung der zellfreien Expression

4.2.1 Solubilisierung der Proteoliposomen durch Detergenzien

Durch das Hinzufügen von Detergenzien kann eine Präzipitation mit Funktionsverlust der Ionenkanäle ebenfalls verhindert werden. Detergenzien eignen sich außerdem gut zur Solubilisierung von Proteinen für weiterführende funktionelle Analysen, wie sie in dieser Arbeit im Rahmen der elektrophysiologischen Charakterisierung stattgefunden haben. Es wurden deshalb zwei gängige Detergenzien in zwei verschiedenen Konzentrationen getestet.

Zur Darstellung der Banden wurde das grün fluoreszierende Protein verwendet. Durch dessen genspezifische Fusion mit dem K2P-Kanal-Protein war es möglich, die synthetisierten K2P-Kanäle durch Anregung mit blauem bzw. ultraviolettem Licht durch Fluoreszenz sichtbar zu machen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die zellfrei synthetisierten K2P-Kanäle aus den Liposomen mit Hilfe von SDC und DDM solubilisieren lassen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass K2P-Kanäle im nativen Gel darstellbar sind. Durch die Wahl dieser nativen Gelelektrophorese und einer somit ausbleibenden Denaturierung der dimeren K2P-Kanäle konnten sowohl die Monomere als auch die Dimere des synthetisierten K2P-Kanals nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.4 a), Banden „a“ und „b“). Durch Vergleich der In-Gel-Bandenintensität der synthetisierten Kanäle zeigte sich, dass bei einer DDM-Konzentration von 1,5 % am meisten Protein solubilisiert werden konnte. Ein Großteil des zellfrei exprimierten Proteins löste sich jedoch nicht und sammelte sich in den Geltaschen an. Der Ertrag an solubiliertem Protein war somit gering (vgl. Kapitel 3.3.2). Aus diesem Grund wurde für die elektrophysiologischen Untersuchungen der K2P-Kanäle auf Detergenzien verzichtet und es wurde auf die Proteoliposomen zurückgegriffen (vgl. Kapitel 4.1.2). Zukünftig sollte die Verwendung von Detergenzien für zellfrei synthetisierte K2P-Kanäle optimiert werden, um auch diese Möglichkeit für weiterführende Analysen nutzen zu können. Die Nutzung von Detergenzien zur Solubilisierung von Proteinen ist mittlerweile eine gängige Methode in Kombination mit

zellfreien Expressionen. Dabei ist zu beachten, dass jedes Detergenz bezüglich der Kompatibilität mit dem zellfreien Expressionssystem variieren kann (Kai et al., 2015).

4.2.2 Verkürzung der Reaktionsdauer

Für funktionelle Analysen, wie sie auch in dieser Arbeit im Rahmen der Messung von Ionenkanalströmen stattgefunden haben, ist es besonders wichtig, eine ausreichend hohe Proteinmenge zu synthetisieren. Es wurde deshalb zunächst bestimmt, bei welcher Translationszeit die Proteinausbeute ihr Plateau erreicht. Die minimale Inkubationszeit für einen ausreichenden Ertrag an Protein wurde anhand von Translationen des K2P-Kanals TREK-1 bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass bereits nach drei und sechs Stunden Translation eine ausreichende Proteinmenge vorhanden ist. Drei Stunden Inkubationszeit reichten nicht bei jedem Ansatz aus, um eine ausreichende Proteinmenge zu gewinnen. Deshalb wurde bei den In-vitro-Translationen der anderen K2P-Kanäle für jeweils sechs Stunden inkubiert, um eine ausreichend hohe Ausbeute an Protein zu garantieren. Längere Inkubationszeiten zeigten keine wesentliche Steigerung der Proteinmenge. Es sollte auch bedacht werden, dass eine zu lange Inkubation die Reaktion behindern könnte, indem sich vermehrt störende Reaktionsprodukte ansammeln. Weiterhin sollte bedacht werden, dass jeder Extrakt und auch jedes Protein, welches in vitro synthetisiert wird, eine individuelle Inkubationszeit hat. So wurde beispielsweise der humane Dopmain-D1-Rezeptor ebenfalls mit dem Weizenkeimextrakt in vitro synthetisiert, dort betrug die optimale Inkubationszeit vierzehn Stunden (Arimitsu et al., 2014). Bei der zellfreien Synthese verschiedener Enzyme des Krankheitserregers der Malaria tropica, Plasmodium falciparum, wurde wiederum für 24 Stunden inkubiert (Mudeppa und Rathod, 2013). Daher kann die In-vitro-Translation von TREK-1 nur als Anhaltspunkt dienen und die Reaktionsdauer sollte für jeden K2P-Kanal zukünftig individuell optimiert werden.

4.3 Nachweis der Funktionalität der in vitro synthetisierten K2P-Kanäle durch elektrophysiologische Untersuchungen in planaren künstlichen Membranen

Nach gelungener In-vitro-Synthese sollte gezeigt werden, dass die K2P-Kanäle funktionsfähig sind. Aufgrund der bereits guten Charakterisierung seiner Einzelkanal-Eigenschaften wurde der Kanal TREK-2 zur Testung der Ionenkanalfunktionalität verwendet (Bang et al., 2000). Es wurden zwei Systeme, der Port-a-Patch und der Orbit Mini, verwendet. Anschließend wurden die beiden Systeme in ihrer Eignung zur Messung von Ionenkanalströmen verglichen.

Insgesamt konnten in circa 50 Messreihen 25 Mal erfolgreich Insertionen beobachtet und 15 Mal Kanalaktivitäten aufgezeichnet werden.

Um Ionenkanalströme am Port-a-Patch zu messen, war es zunächst nötig, einen künstlichen Bilayer aus GUV zu generieren. Insgesamt konnten mehrmals GUV in ausreichender Anzahl für die Messungen bereitgestellt werden. Einige Bilayer waren jedoch sehr instabil und kurzlebig, sodass die Ionenkanalmessungen insgesamt nicht unter optimalen Bedingungen durchgeführt werden konnten. Eine Bilayerinstabilität war beispielsweise bei einer Volumenzunahme der Lösung durch das Hinzufügen der Proteoliposomen oder beim Anlegen einer Spannung zu beobachten.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen an den zellfrei synthetisierten TREK-2-Kanälen waren zudem insgesamt sehr zeitaufwendig. Dies lag zum einen an oben genanntem Problem, weiterhin erfolgten die Insertionen der Kanäle in den Bilayer in nur circa der Hälfte der Messungen. Um den Port-a-Patch als alternatives Messsystem zum herkömmlichen Patch-Clamp-System zu etablieren und um zum Beispiel Strom-Spannungs-Beziehungen darzustellen, benötigt es daher noch einiger Optimierungen. Dennoch ist das System eine wertvolle Alternative zur herkömmlichen Patch-Clamp-Technik. So können Proteine außerhalb einer natürlichen Zellmembran untersucht werden, was neue Möglichkeiten zur Charakterisierung der Proteine aufzeigt. Durch Messungen am Port-a-Patch konnte bereits die Funktionalität mehrerer in vitro synthetisierter Ionenkanäle bestätigt werden: So wurde beispielsweise das p7-Viroporin des Hepatitis-C-Virus, welches ebenfalls zellfrei synthetisiert wurde, funktionell

Diskussion

charakterisiert (Soranzo et al., 2016). Auch die Mechanosensitivität eines trunkierten TREK-2-Kanals wurde bereits mit dem Port-a-Patch untersucht (Clausen et al., 2017).

Da es sich bei der Verwendung des Port-a-Patch als schwierig erwies, stabile Bilayer zu generieren, wurde in dieser Arbeit ein weiteres Messsystem getestet. Unter Verwendung des Orbit Mini ist es möglich, parallel vier künstliche Membranen zu generieren und Ionenkanalströme zu messen. Die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Insertion der K2P-Kanäle ist somit generell höher. Weiterhin bestanden die hier verwendeten Bilayer aus in Oktan gelöstem Lipid und die relativ störanfällige GUV-Synthese stellte somit keinen kritischen Einflussfaktor dar. Die Bilayer waren sehr stabil und langlebig. Auch durch Messungen am Orbit Mini konnte gezeigt werden, dass der K2P-Kanal TREK-2 eine Funktionalität besitzt. Dies konnte dadurch bestätigt werden, dass nach Applikation des TREK-2-Aktivators BL 1249 Ionenkanalströme sichtbar waren. Bei einer Insertion endogener Weizenkeimkanäle in die künstliche Membran wäre nach Applikation des K2P-Kanal spezifischen Aktivators keine Aktivierung zu erwarten gewesen. Dass es sich bei den messbaren Strömen um TREK-2 Kanäle handelt, lässt sich wie in den Port-a-Patch-Messungen durch die Amplitudenhöhe der Ionenkanäle belegen. In der Literatur sind Amplituden von ca. 5 pA bis 10 pA beschrieben, was den gemessenen Amplituden in dieser Arbeit entspricht. Auch die Öffnungszeit der Kanäle mit wenigen Millisekunden entspricht den Literaturangaben (Bang et al., 2000; Kim et al., 2001). Da die Messungen häufig instabil waren, konnten jedoch nur wenige ausreichend stabile und lange Messungen generiert werden. Diese reichten zum Nachweis der Funktionalität des zellfrei synthetisierten K2P-Kanals aus, jedoch nicht zur Darstellung zum Beispiel einer Strom-Spannungs-Beziehung.

Zukünftig sollten die Reaktionsbedingungen weiter optimiert werden. Insbesondere die Ionenkanalfunktionsmessungen erweisen sich noch als sehr schwierig: Zum einen sind die verwendeten künstlichen Membranen sehr instabil und ermöglichen keine optimalen Messbedingungen. Weiterhin dauerte es teilweise sehr lange, bis die K2P-Kanäle spontan in die Bilayer insertierten. Hier sollte in Zukunft eine Möglichkeit gefunden werden, wie die K2P-Kanäle schneller und verlässlicher mit den künstlichen Membranen fusionieren können.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit sollte die Möglichkeit der zellfreien Expression der K2P-Kanäle systematisch untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass elf der zwölf K2P-Kanäle zellfrei synthetisierbar sind. Die Zahl der in der Literatur beschriebenen in vitro synthetisierten Proteine nimmt stetig zu. Besonders interessant sind in Anbetracht dieser Arbeit die bereits beschriebenen zellfreien Expressionen von Ionenkanälen: So wurden unter anderem bereits Natriumkanäle (Kováčsová et al., 2015), hERG-Kanäle (engl. human Ether-a-go-go Related Gene channel; kardiale Kaliumkanäle; Tadaki et al., 2017) und spannungsaktivierte Kv-Kaliumkanäle (Cortes et al., 2018) zellfrei synthetisiert.

Die zellfreie Proteinsynthese bietet somit die Möglichkeit, die Familie der K2P-Kanäle zukünftig ohne zelluläre Integrität zu untersuchen. Dies wird unter anderem durch das Hinzufügen eines membranähnlichen Milieus in Form von Liposomen ermöglicht, in welche die K2P-Kanäle insertieren können. Als Alternative lassen sich zukünftig möglicherweise auch andere membranähnliche Milieus nutzen, wie zum Beispiel Nanodiscs. Nanodiscs sind scheibenartige, nanometergroße Phospholipiddoppelschichten, welche von zwei Kopien des sogenannten „membrane scaffold protein“ (MSP) umgeben sind. Nanodiscs besitzen gegenüber Liposomen den Vorteil, dass sie eine homogene Größe besitzen und dass Membranproteine in Nanodiscs eine höhere Stabilität besitzen. Weiterhin können die zellfrei hergestellten Membranproteine von beiden Seiten in Nanodiscs insertieren, da Nanodiscs, anders als Liposomen, ein System mit offenem Zugang zu beiden Seiten der Phospholipiddoppelschichten sind (Pavlidou et al., 2013). In Nanodiscs insertierte Membranproteine lassen sich unter anderem kryoelektronenmikroskopisch in einer relativ natürlichen Umgebung für Membranproteine untersuchen. Dieses Verfahren zur Untersuchung des Proteins kann die sonst häufig zur Strukturaufklärung eingesetzte Proteinkristallisation ersetzen (Sun et Gennis, 2019). Eine weitere Möglichkeit, die die zellfreie Proteinsynthese bietet, ist das vergleichsweise einfache Hinzufügen unnatürlicher Aminosäuren zur Translationsreaktion. Dies bietet die Möglichkeit, Proteine beispielsweise positionsspezifisch mit Fluoreszenzmarkierungen zu versehen

Diskussion

und die Eigenschaften und Funktionen der zellfrei hergestellten K2P-Kanäle und auch anderer Proteine gesteuert zu modifizieren (Gao et al., 2019).

Weiterhin konnte anhand von TREK-2 der elektrophysiologische Nachweis eines zellfrei synthetisierten K2P-Kanals erfolgen. Die Messung in planaren Bilayern bedarf jedoch noch einiger Optimierungen, um zukünftig auch die Beschreibung bisher kaum charakterisierter Kanäle, wie zum Beispiel des K2P-Kanals KCNK7, zu ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Die Zwei-Porendomänen Kaliumkanäle (K2P-Kanäle) sind eine der vier Unterfamilien der Kaliumkanäle. Die Ionenkanäle sind entscheidend an der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials beteiligt. Außerdem sind sie an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel der Regulation neuronaler Erregbarkeit und der Regulation von Sekretionsvorgängen. Da die K2P-Kanäle entsprechend ihres Namens zwei Porendomänen im Tandem besitzen, wird die Tetrasymmetrie der kaliumselektiven Pore durch Dimerisierung erreicht, was die Kanäle von den anderen Kaliumkanal-Klassen unterscheidet. Die K2P-Kanäle unterliegen zahlreichen Regulationsmechanismen. So werden die Kanäle unter anderem durch Pharmaka, Lipide, Veränderungen des pH-Wertes und Temperaturveränderungen reguliert. Die K2P-Kanäle wurden bisher in nativen Zellen und in heterologen Expressionssystemen durch die Patch-Clamp-Technik untersucht und charakterisiert. Einige Fragestellungen, wie z.B. die Lipidregulation der K2P-Kanäle, lassen sich hiermit aufgrund der zellulären Umgebung jedoch nur schwer untersuchen. Eine rekombinante Herstellung konnte bisher nur unter Trunkierung der C- und N-Termini erreicht werden. Dadurch konnten C-terminal vermittelte Regulationsmechanismen jedoch bisher nicht untersucht werden, weiterhin wurden die Einzelkanaleigenschaften durch die Trunkierungen verändert. Die in dieser Arbeit verwendete zellfreie Proteinsynthese bietet deshalb eine interessante Alternative, um K2P-Kanäle ohne zelluläre Umgebung und ohne Veränderung der Kanaleigenschaften zu untersuchen.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit zwölf der fünfzehn bekannten K2P-Kanäle untersucht. Die K2P-Kanäle konnten zunächst zellfrei transkribiert werden. Im Anschluss wurden die K2P-Kanäle zellfrei mit Hilfe des Weizenkeimextraktes translatiert. Der Reaktion wurden Liposomen hinzugefügt, um den Ionenkanälen ein membranähnliches Milieu zur kotranslationalen Insertion zu bieten. Elf der zwölf getesteten K2P-Kanäle konnten zellfrei hergestellt werden. Es wurde außerdem festgestellt, dass die Reaktionszeit verkürzt werden konnte, ohne einen Verlust an Proteinmenge zu erzielen. Weiterhin wurden Versuche zur Solubilisierung der K2P-Kanäle durchgeführt. Eine Solubilisierung war möglich, zeigte sich aufgrund der geringen Konzentrationen an solubilisiertem Protein

Zusammenfassung

jedoch für weitere Untersuchungen als weniger geeignet. Zur Prüfung der Funktionalität der zellfrei exprimierten Kanäle wurden abschließend elektrophysiologische Untersuchungen an planaren künstlichen Membranen durchgeführt. Hierfür wurden die oben beschriebenen Proteoliposomen verwendet. Es konnte anhand des K2P-Kanals TREK-2 gezeigt werden, dass eine zellfreie Expression zur Bildung eines funktionellen Ionenkanals führt.

Die zellfreie Proteinsynthese bietet somit die Möglichkeit, K2P-Kanäle in Zukunft genauer zu charakterisieren, zum Beispiel durch das Hinzufügen unnatürlicher Aminosäuren zur zellfreien Translation oder durch kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen der K2P-Kanäle in Liposomen oder Nanodiscs. Weiterhin ist es durch die zellfreie Proteinsynthese möglich, bisher offene Fragestellungen, wie zum Beispiel die Lipidregulation der Kanäle, zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

- Arimitsu, E., Ogasawara, T., Takeda, H., Sawasaki, T., Ikeda, Y., Hiasa, Y., Maeyama, K. (2014): The ligand binding ability of dopamine D 1 receptors synthesized using a wheat germ cell-free protein synthesis system with liposomes. *Eur. J. Pharmacol.*, 745, 117-122.
- Ashmole, I., Goodwin, P. A., Stanfield, P. R. (2001): TASK-5, a novel member of the tandem pore K⁺ channel family. *Pflugers Arch.*, 442, 828-833.
- Bang, H., Kim, Y., Kim, D. (2000): TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K⁺ channel family. *J. Biol. Chem.*, 275(2), 17412-17419.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2009): *Stryer Biochemie*. 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Besana, A., Barbuti, A., Tateyama, M. A., Symes, A. J., Robinson, R. B., Feinmark, S. J., (2004): Activation of protein kinase C ϵ inhibits the two-pore domain K⁺ channel, TASK-1, inducing repolarization abnormalities in cardiac ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.*, 279(32), 33154–33160.
- Blondeau, N., Pétrault, O., Manta, S., Giordanengo, V., Gounon, P., Bordet, R., Lazdunski, M., Heurteaux, C. (2007): Polyunsaturated fatty acids are cerebral vasodilators via the TREK-1 potassium channel. *Circ. Res.*, 101(2), 176–184.
- 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⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 110(6), 2129–2134.
- Brohawn, S. G., Campbell, E. B., MacKinnon, R. (2014): Physical mechanism for gating and mechanosensitivity of the human TRAAK K⁺ channel. *Nature*, 516(7529), 126130.

Literaturverzeichnis

- Brohawn, S. G., del Marmol, J., MacKinnon, R. (2012): Crystal structure of the human K₂P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K⁺ ion channel. *Science*, 335(6067), 436441.
- Chatelain, F. C., Bichet, D., Douguet, D., Feliciangeli, S., Bendahhou, S., Reichold, M., Warth, R., Barhanin, J., Lesage, F. (2012): TWIK1, a unique background channel with variable ion selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 109(14), 5499–5504.
- Chemin, J., Patel, A. J., Duprat, F., Lauritzen, I., Lazdunski, M., Honoré, E. (2005): A phospholipid sensor controls mechanogating of the K⁺ channel TREK-1. *EMBO J.*, 24, 44–53.
- Chen, A. X., Nishimoto, K., Nanba, K., Rainey, W. E. (2015): Potassium channels related to primary aldosteronism: Expression similarities and differences between human and rat adrenals. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 417, 141-148.
- Chen, X., Talley, E. M., Patel, N., Gomis, A., McIntire, W. E., Dong, B., Viana, F., Garrison, J. C., Bayliss, D. A. (2006): Inhibition of a background potassium channel by Gq protein α -subunits. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A*, 103(9), 3422-3427.
- Clausen, M. V., Jarerattanachit, V., Carpenter, E. P., Sansom, M. S. P., Tucker, S. J. (2017): Asymmetric mechanosensitivity in a eukaryotic ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 114(40), E8343-E8351.
- Cluzeaud, F., Reyes, R., Escoubet, B., Fay, M., Lazdunski, M., Bonvalet, J. P., Lesage, F., Farman, N. (1998): Expression of TWIK-1, a novel weakly inward rectifying potassium channel in rat kidney. *Am. J. Physiol.*, 275, C1602–C1609.
- 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.

Literaturverzeichnis

- Cortes, S., Barette, C., Beroud, R., De Waard, M., Schaack, B. (2018): Functional characterization of cell-free expressed $K_v1.3$ channel using a voltage-sensitive fluorescent dye. *Protein. Expr. Purif.*, 145, 94-99.
- Czirják, G., Fischer, T., Spät, A., Lesage, F., Enyedi, P. (2000): TASK (TWIK-related acid-sensitive K^+ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol. Endocrinol.*, 14(6), 863-874.
- 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.
- Duprat, F., Girard, C., Jarretou, G., Lazdunski, M. (2005): Pancreatic two P domain K^+ channels TALK-1 and TALK-2 are activated by nitric oxide and reactive oxygen species. *J. Physiol.*, 562.1, 235-244.
- Duprat, F., Lesage, F., Patel, A. J., Fink, M., Romey, G., Lazdunski, M. (2000): The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K^+ channels TREK-1 and TRAAK. *Mol. Pharmacol.*, 57, 906-912.
- Dyballa, N., Metzger, S. (2009): Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *J. Vis. Exp.*, 30, 1431-1435.
- Endo, Y., Oka, T., Ogata, K., Natori, Y. (1993): Production of dihydrofolate reductase by an improved continuous flow cell-free translation system using wheat germ extract. *Tokushima J. Exp. Med.*, 40 (1-2), 13-17.
- Enyedi, P., Czirják, G. (2010): Molecular background of leak K^+ currents: Two-pore domain potassium channels. *Physiol. Rev.*, 90(2), 559-605.

Literaturverzeichnis

- Ezure, T., Suzuki, T., Shikata, M., Ito, M., Ando, E. (2010): A cell-free protein synthesis system from insect cells. *Methods Mol. Biol.*, 607, 31-42.
- Feliciangeli, S., Chatelain, F. C., Bichet, D., Lesage, F. (2015): The family of K_{2P} 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⁺ 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⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J.*, 17(12), 3297-3308.
- Gao, W., Cho, E., Liu, Y., Lu, Y. (2019): Advances and challenges in cell-free incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Front Pharmacol.*, 10, 611.
- Garry, A., Fromy, B., Blondeau, N., Henrion, D., Brau, F., Gounon, P., Guy, N., Heurteaux, C., Lazdunski, M., Saumet, J. L. (2007): Altered acetylcholine, bradykinin and cutaneous pressure-induced vasodilation in mice lacking the TREK1 potassium channel: the endothelial link. *EMBO Rep.*, 8(4), 354–359.
- Girard, C., Duprat, F., Terrenoire, C., Tinel, N., Fosset, M., Romey, G., Lazdunski, M., Lesage, F. (2001): Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K⁺ channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282(1), 249–256.
- Goren, M. A., Fox, B. G. (2008): Wheat germ cell-free translation, purification, and assembly of a functional human stearoyl-CoA desaturase complex. *Cell*, 62(2), 171–178.
- Gurney, A. M., Osipenko, O. N., MacMillan, D., McFarlane, K. M., Tate, R. J., Kempson, F. E. J. (2003): Two-Pore Domain K Channel, TASK-1, in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.*, 93(10), 957–964.

Literaturverzeichnis

- Harbers, M. (2014): Wheat germ systems for cell-free protein expression. *FEBS Lett.*, 588, 2762-2773.
- Heurteaux, C., Lucas, G., Guy, N., El Yacoubi, M., Thümmler, S., Peng, X.-D., Noble, F., Blondeau, N., Widmann, C., Borsotto, M., Gobbi, G., Vaugeois, J.-M., Debonnel, G., Lazdunski, M. (2006): Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat. Neurosci.*, 9(9), 1134–1141.
- Honoré, E. (2007): The neuronal background K_{2P} channels: focus on TREK1. *Nat. Rev. Neurosci.*, 8, 251–261.
- Huang, D.-Y., Yu, B.-W., Fan, Q.-W. (2008): Roles of TRESK, a novel two-pore domain K^+ channel, in pain pathway and general anesthesia. *Neurosci. Bull.*, 24(3), 166–172.
- Jarecki, B. W., Makino, S., Beebe, E. T., Fox, B. G., & Chanda, B. (2013): Function of Shaker potassium channels produced by cell-free translation upon injection into *Xenopus* oocytes. *Sci. Rep.*, 3, 1040-1046.
- Jermutus, L., Ryabova, L. A., Plückthun, A. (1998): Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9(5), 534–548.
- Jones, S. A., Morton, M. J., Hunter, M., Boyett, M. R. (2002): Expression of TASK-1, a pH-sensitive twin-pore domain K^+ channel, in rat myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 283(1), H181–H185.
- Junge, F., Haberstock, S., Roos, C., Stefer, S., Proverbio, D., Dötsch, V., Bernhard, F. (2011): Advances in cell-free protein synthesis for the functional and structural analysis of membrane proteins. *N. Biotechnol.*, 28(3), 262-271.
- Kai, L., Orbán, E., Henrich, E., Proverbio, D., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2015): Cotranslational stabilization of insoluble proteins in cell-free expression systems. *Methods Mol. Biol.*, 1258, 125-143.

Literaturverzeichnis

- Kang, D., Choe, C., Kim, D. (2005): Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *J. Physiol.*, 564(1), 103–116.
- Kang, D., Kim, D. (2004): Single-channel properties and pH sensitivity of two-pore domain K⁺ channels of the TALK family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315, 836-844.
- Kanoi, B. N., Takashima, E., Morita, M., White, M. T., Palacpac, N. M. Q., Ntege, E. H., Balikagala, B., Yeka, A., Egwang, T.G., Horii, T., Tsuboi, T. (2017): Antibody profiles to wheat germ cell-free system synthesized Plasmodium falciparum proteins correlate with protection from symptomatic malaria in Uganda. *Vaccine*, 35(6), 873–881.
- Katzen, F., Peterson, T. C., Kudlicki, W. (2009): Membrane protein expression: no cells required. *Trends Biotechnol.*, 27(8), 455-460.
- Kennard, L. E., Chumbley, J. R., Ranatunga, K. M., Armstrong, S. J., Veale, E. L., Mathie, A. (2005): Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Br. J. Pharmacol.*, 144(6), 821–829.
- Kim, C.-W., Choe, C., Kim, E.-J., Lee, J.-I., Yoon, S.-Y., Cho, Y.-W., Han, S., Tak, H.-M., Han, J., Kang, D. (2012): Dual effects of fluoxetine on mouse early embryonic development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 265(1), 61–72.
- Kim, D., Gnatenco, C. (2001): TASK-5, a new member of the tandem-pore K⁺ channel family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 284(4), 923-930.
- Kim, Y., Bang, H., Gnatenco, C., Kim, D. (2001): Synergistic interaction and the role of C-terminus in the activation of TRAAK K⁺ channels by pressure, free fatty acids and alkali. *Pflugers Arch.*, 442, 64-72.
- Kimura-Soyema, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S. (2014): Cell-free membrane protein expression. *Methods Mol. Biol.*, 1118, 267-274.

Literaturverzeichnis

- Kovácsová, G., Gustavsson, E., Wang, J., Kreir, M., Peuker, S., Westenhoff, S. (2015): Cell-free expression of a functional pore-only sodium channel. *Protein Expr. Purif.*, 111, 42–47.
- Lafrenière, R. G., Rouleau, G. A. (2011): Migraine: Role of the TRESK two-pore potassium channel. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 43, 1533–1536.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., Barhanin, J. (1996): TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ 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), F793-801.
- Lesage, F., Maingret, F., Lazdunski, M. (2000): Cloning and expression of human TRAAK, a polyunsaturated fatty acids-activated and mechano-sensitive K⁺ channel. *FEBS Lett.*, 471, 137–140.
- Liu, C., Au, J. D., Zou, H. L., Cotten, J. F., Yost, C. S. (2004): Potent activation of the human tandem pore domain K channel TRESK with clinical concentrations of volatile anesthetics. *Anesth. Analg.*, 99(6), 1715–1722.
- Liu, H., Enyeart, J. A., Enyeart, J. J. (2007): Potent inhibition of native TREK-1 K⁺ channels by selected dihydropyridine Ca²⁺ channel antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 323(1), 39–48.
- Lloyd, E. E., Crossland, R. F., Phillips, S. C., Marrelli, S. P., Reddy, A. K., Taffet, G. E., Hartley, C. J., Bryan, R. M. (2011): Disruption of K_{2P}6.1 produces vascular dysfunction and hypertension in mice. *Hypertension*, 58(4), 672-678.
- Lolicato, M., Arrigoni, C., Mori, T., Sekioka, Y., Bryant, C., Clark, K. A., Minor, D. L. Jr. (2017): K_{2P}2.1(TREK-1): activator complexes reveal a cryptic selectivity filter binding site. *Nature*. 547(7663), 364–368.

Literaturverzeichnis

- 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.
- Maingret, F., Lauritzen, I., Patel, A. J., Heurteaux, C., Reyes, R., Lesage, F., Lazdunski, M., Honoré, E. (2000): TREK-1 is a heat-activated background K⁺ channel. *EMBO J.*, 19(11), 2483–2491.
- Maingret, François, Patel, A. J., Lesage, F., Lazdunski, M., & Honoré, E. (1999): Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J. Biol. Chem.*, 274(38), 26691-26696.
- Mathews, M. B., Osborn, M., Lingrel, J. B. (1971): Translation of Globin Messenger RNA in a Heterologous Cell-free System. *Nat New Biol.*, 233(41), 206-209.
- Mathie, A., Al-Moubarak, E., Veale, E. L. (2010): Gating of two pore domain potassium channels. *J. Physiol.*, 588(17), 3149–3156.
- 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. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 86, 101-114.
- Miller, A. N., Long, S. B. (2012): Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel K2P1. *Science*. 335, 432–437.
- Milosavljevic, N., Duranton, C., Djerbi, N., Puech, P. H., Gounon, P., Lagadic-Gossmann, D., Dimanche-Boitrel, M. T., Rauch, C., Tauc, M., Counillon, L., Poët, M. (2010): Nongenomic effects of cisplatin: Acute inhibition of mechanosensitive transporters and channels without actin remodeling. *Cancer Res.*, 70(19), 75147523.
- Mudeppa, D. G., Rathod, P. K. (2013): Expression of functional Plasmodium falciparum enzymes using a wheat germ cell-free system. *Eukaryot. Cell*, 12(12), 1653–1663.

- Mülhardt, C. (2013): *Der Experimentator Molekularbiologie Genomics*. 7. Auflage, Springer Spektrum, Berlin Heidelberg.
- Nayak, T. K., Harinath, S., Nama, S., Somasundaram, K., Sikdar, S. K. (2009): Inhibition of human two-pore domain K⁺ channel TREK1 by local anesthetic lidocaine: negative cooperativity and half-of-sites saturation kinetics. *Mol. Pharmacol.*, 76(4), 903–917.
- Nirenberg, M. W., Matthaei, J. H. (1961): The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 47, 1588–1602.
- Noirot, C., Habenstein, B., Bousset, L., Melki, R., Meier, B. H., Endo, Y., Penin, F., Böckmann, A. (2011): Wheat-germ cell-free production of prion proteins for solid-state NMR structural studies. *N. Biotechnol.*, 28(3), 232–238.
- Patel, A. J., Maingret, F., Magnone, V., Fosset, M., Lazdunski, M., Honore, E. (2000): TWIK-2, an inactivating 2P domain K⁺ channel. *J. Biol. Chem.*, 275(37), 28722–28730.
- 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⁺ 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⁺ channels. *Nat. Neurosci.*, 2(5), 422–426.
- Pavlidou, M., Hänel, K., Möckel, L., Willbold, D. (2013): Nanodiscs allow phage display selection for ligands to non-linear epitopes on membrane proteins. *PLoS ONE*, 8(9), e72272.
- Pelham, H. R. B., Jackson, R. J. (1976): An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.*, 67(1), 247–256.

Literaturverzeichnis

- Piechotta, P. L., Rapedius, M., Stansfeld, P. J., Bollepalli, M. K., Ehrlich, G., Andres-Enguix, I., Fritzenschaft, H., Decher, N., Sansom, M. S. P., Tucker, S. J., Baukrowitz, T. (2011): The pore structure and gating mechanism of K2P channels. *EMBO J.*, 30, 3607–3619.
- Rademacher, F., Simanski, M., Harder, J. (2016): RNase 7 in cutaneous defense. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(4), 560-572.
- Rajan, S., Wischmeyer, E., Karschin, C., Preisig-Müller, R., Grzeschik, K. H., Daut, J., Karschin, A., Derst, C. (2001): THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels. *J. Biol. Chem.*, 276(10), 7302-73011
- Rehm, H., Letzel, T. (2010): *Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics*. 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- 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⁺ channel from human kidney. *J. Biol. Chem.*, 273(47), 30863–30869.
- Roberts, B. E., Paterson, B. M. (1973): Efficient translation of Tobacco Mosaic virus RNA and Rabbit Globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 70(8), 2330–2334.
- Rödström, K. E. J., Kiper, A. K., Zhang, W., Rinne, S., Pike, A. C. W., Goldstein, M., Conrad, L. J., Delbeck, M., Hahn, M. G., Meier, H., Platzk, M., Quigley, A., Speedman, D., Shrestha, L., Mukhopadhyay, S. M. M., Burgess-Brown, N. A., Tucker, S. J., Müller, T., Decher, N., Carpenter, E. P. (2020): A lower X-gate in TASK channels traps inhibitors within the vestibule. *Nature*, 582, 443-447.
- Sachse, R., Dondapati, S. K., Fenz, S. F., Schmidt, T., Kubick, S. (2014): Membrane protein synthesis in cell-free systems: From bio-mimetic systems to bio-membranes. *FEBS Lett.*, 588(17), 2774–2781.

Literaturverzeichnis

- 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., 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⁺ channel, TRESK, is localized in the spinal cord. *J. Biol. Chem.*, 278(30), 27406-27412.
- Savage, D. F., Anderson, C. L., Robles-Colmenares, Y., Newby, Z. E., Stroud, R. M. (2007): Cell-free complements in vivo expression of the *E. coli* membrane proteome. *Protein Sci.*, 16, 966–976.
- Sawasaki, T., Hasegawa, Y., Tsuchimochi, M., Kamura, N., Ogasawara, T., Kuroita, T., Endo, Y. (2002b): A bilayer cell-free protein synthesis system for high-throughput screening of gene products. *FEBS Lett.*, 514, 102-105.
- Sawasaki, T., Ogasawara, T., Morishita, R., Endo, Y. (2002a): A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 99(23), 14652–14657.
- 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 K2P K⁺ channels. *Cell*, 164(5), 937949.

Literaturverzeichnis

- Schewe, M., Sun, H., Mert, Ü., Mackenzie, A., Pike, A. C. W., Schulz, F., Constantin, C., Vowinkel, K. S., Conrad, L. J., Kiper, A. K., Gonzalez, W., Musinszki, M., Tegtmeier, 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 masterkey mechanism to unlock the selectivity filter gate in K⁺ channels. *Science*, 363(6429), 875-880.
- Schwarz, D., Junge, F., Durst, F., Frölich, N., Schneider, B., Reckel, S., Sobhanifar, S., Dötsch, V., Bernhard, F. (2007): Preparative scale expression of membrane proteins in Escherichia coli-based continuous exchange cell-free systems. *Nat. Protoc.*, 2(11), 2945-2957.
- Sobhanifar, S., Reckel, S., Junge, F., Schwarz, D., Kai, L., Karbyshev, M., Löhr, F., Bernhard, F., Dötsch, V. (2010): Cell-free expression and stable isotope labelling strategies for membrane proteins. *J. Biomol. NMR*, 46(1), 33-43.
- Soranzo, T., Cortès, S., Gilde, F., Kreir, M., Picart, C., Lenormand, J. L. (2016): Functional characterization of p7 viroporin from hepatitis C virus produced in a cell-free expression system. *Protein Expr. Purif.*, 118, 83-91.
- Spirin, A. S., Baranov, V. I., Ryabova, L. A., Ovodov, S. Y., Alakhov, Y. B. (1988): A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Mol. Cell. Biol.*, 242, 1162-1165.
- Struhl, K. (2001): Synthesizing Proteins In Vitro by Transcription and Translation of Cloned Genes. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 10, 10.17.1-10.17-5.
- Sun, C., Gennis, R. B. (2019): Single particle cryo-EM studies of transmembrane proteins in SMA copolymer nanodiscs. *Chem. Phys. Lipids.*, 221, 114-119.

Literaturverzeichnis

- Tadaki, D., Yamaura, D., Araki, S., Yoshida, M., Arata, K., Ohori, T., Ishibashi, K., Kato, M., Ma, T., Miyata, R., Tozawa, Y., Yamamoto, H., Niwano, M., Hirano-Iwata, A. (2017): Mechanically stable solvent-free lipid bilayers in nano- and micro-tapered apertures for reconstitution of cell-free synthesized hERG channels. *Sci. Rep.*, 7(1), 1–10.
- 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.
- Talley, E. M., Bayliss, D. A. (2002): Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (Kcnk9) potassium channels. Volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action. *J. Biol. Chem.*, 277(20), 17733-17742.
- Tertyshnikova, S., Knox, R. J., Plym, M. J., Thalody, G., Griffin, C., Neelands, T., Harden, D. G., Signor, L., Weaver, D., Myers, R. A., Lodge, N. J. (2004): BL-1249 [(5,6,7,8Tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl]-amine]: A putative potassium channel opener with bladder-relaxant properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 313(1), 250-259.
- Theilig, F., Goranova, I., Hirsch, J. R., Wieske, M., Ünsal, S., Bachmann, S., Veh, R. W., Derst, C. (2008): Cellular localization of THIK-1 (K_{2P}13.1) and THIK- 2 (K_{2P}12.1) K⁺ channels in the mammalian kidney. *Cell Physiol. Biochem.*, 21, 63–74.
- Thümmler, S., Duprat, F., Lazdunski, M. (2007): Antipsychotics inhibit TREK but not TRAAK channels. *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, 354(1), 284-289.
- Voloshyna, I., Besana, A., Castillo, M., Matos, T., Weinstein, I. B., Mansukhani, M., Robinson, R. B., Cordon-Cardo, C., Feinmark, S. J. (2008): TREK-1 is a novel molecular target in prostate cancer. *Cancer Res.*, 68(4), 1197-1204.
- Whittaker, J. W. (2013): Cell-free protein synthesis: The state of the art. *Biotechnol. Lett.*, 35(2), 143–152.

Literaturverzeichnis

Wittig, I., Braun, H.-P., Schägger, H. (2006): Blue native PAGE. Nat. Protoc., 1(1), 418-428.

Yost, C. S., Oh, I., Eger II, E. I., & Sonner, J. M. (2008). Knockout of the gene encoding the K_{2P} channel KCNK7 does not alter volatile anesthetic sensitivity. Behav. Brain Res., 193(2), 192–196.

7. Anhang

Verwendete Geräte

BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland

Ultraschallbad Sonorex RK 52

Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

ChemiDoc™ MP Imaging System

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Sprout Minizentrifuge

Elements SRL, Cesena, Italien

EDR 3 Software

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Centrifuge 5430 R, Eppendorf BioPhotometer®, Eppendorf Thermomixer® comfort

Anhang

GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland

Kreisschüttler Bestell-Nr. 3005

HEKA, Lambrecht (Pfalz)

EPC 10 Patch-Clamp-Verstärker, Patchmaster Software

IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland

C-MAG HS 7, Magnetrührer mit Heizung und Heizplatte

Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland

Brutschrank

Nanion Technologies GmbH, München, Deutschland

Orbit mini, Port-a-Patch, Vesicle Prep Pro

neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland

Vortexer D-6012

Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Nanodrop

Verwendete Reagenzien

Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Alabama

1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC)

Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Clarity™ Western ECL Blotting Substrate, 4x Laemmli Sample Buffer, Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, QC Colloidal Coomassie Stain

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

6-Aminohexansäure, Aceton, Agarose Broad Range, Ammoniumperoxodisulfat, Dodecyl- β -D-maltosid, Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat, Essigsäure 100%, Ethanol, Glycin, Imidazol, Hydrochlorid, Methanol, Milchpulver, Natriumchlorid, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:25:1), Roti®-GelStain, Rotiphorese®, 50x TAE Puffer, Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1), Salzsäure, TEMED 99%, TRICIN, TRIS PUFFERAN®, Tween® 20

CellFree Sciences Co., Ltd., Yokohama, Japan

1 x SUB-AMIX (Zusammensetzung: siehe S. 91-9), WEPRO 1240/1240H Expression Kit

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Kaliumchlorid, Kaliumhydroxid

PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Dulbeccos' s PBS (1x)

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Kreatinkinase

Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA

Goat anti-mouse IgG-HRP (Polyklonaler Antikörper gegen die leichte Kette des Maus-IgG, Meerettich-Peroxidase-konjugiert, 400 µg/ml)

Anhang

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany

2-Propanol, BL-1249, Chloroform, Cholesterol, EGTA, Formaldehyde solution, Glycerol, HEPES, DL-Dithiothreitol, Octane, Potassium hexacyanoferrate(III), Silbernitrat, SDS, Sodium deoxycholate, Sodium thiosulfate, Spermidine, Tetrapentylammonium chloride

Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

6x-His Epitope Tag Antibody (His, H8, Monoklonaler Antikörper gegen den 6x Histidin Tag, 1 mg/ml), ATP Solution (100 mM), CTP Solution (100 mM), DNA Gel Loading Dye (6X), GeneRuler 1 kb DNA Ladder, GTP Solution (100 mM), HisPur™ Ni-NTA Resin, 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 5.2, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Pierce™ HA Epitope Tag Antibody (2-2.2.14), Pierce™ Prestained Protein MW Marker, RiboLock RNase Inhibitor 40 U/μl 2500U, SP6 RNA Polymerase 20 U/μl 2000 U, Tris-EDTA-Puffer, 1X-Lösung, pH 7.4, UTP Solution (100 mM), Water nuclease-free

Verwendete Puffer und Lösungen

Transkriptionspuffer

HEPES-KOH (pH 7,8)	400 mM
Magnesiumacetat	80 mM
Spermidin	10 mM
DTT	50 mM

SUV-Puffer

HEPES-KOH (pH 7)	10 mM
-------------------------	-------

Anhang

Trenngelpuffer für die SDS-PAGE

Tris (pH 8,8)	1,5 M
SDS	0,40 %

Sammelgelpuffer für die SDS-PAGE

Tris (pH 6,8)	0,5 M
SDS	0,40 %

Laufpuffer für die SDS-PAGE

pH ~ 8,3; nicht eingestellt	
Glycin	192 mM
Tris	25 mM
SDS	0,10 %

AB-3 Mix für das Gradientengel; Angaben auf 100 ml Aqua dest.

Acrylamid	48 g
Bisacrylamid	1,5 g

Gelpuffer für das Gradientengel

Imidazol-HCl (pH 7)	75 mM
ϵ-Aminocapronsäure	1,5 M

Anhang

Kathodenpuffer (10-fach) für das Gradientengel

Tricine (pH 7,0)	500 mM
Imidazol	75 mM
Natriumdeoxycholat	0,50 %

Anodenpuffer (10-fach) für das Gradientengel

Imidazol-HCl (pH 7)	250 mM
----------------------------	--------

Tank-Blot-Puffer für den Western Blot

Glycin	192 mM
Tris-HCl (pH 8.3)	25 mM
SDS	0,01 %

TBST-Puffer für den Western Blot, pH 7,4

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
Tween® 20	0,05 %

Kaliumlösung für die Messungen im Bilayer

KCl	1 M
HEPES-KOH (pH 7,22)	10 mM
EGTA	2 mM

Anhang

1 x SA-Puffer (= SUB-AMIX-Puffer)

L-Alanin	0,3 mM
L-Arginin	0,3 mM
L-Asparagin	0,3 mM
L-Asparaginsäure	0,3 mM
L-Cystein	0,3 mM
L-Glutamin	0,3 mM
L-Glutaminsäure	0,3 mM
Glycin	0,3 mM
L-Histidin	0,3 mM
L-Isoleucin	0,3 mM
L-Leucin	0,3 mM
L-Lysin	0,3 mM
L-Methionin	0,3 mM
L-Phenylalanin	0,3 mM
L-Prolin	0,3 mM
L-Serin	0,3 mM
L-Threonin	0,3 mM
L-Tryptophan	0,3 mM
L-Tyrosin	0,3 mM
L-Valin	0,3 mM

Anhang

Kaliumacetat	100 mM
Magnesiumacetat	2,7 mM
Dinatrium-Kreatinphosphat-Tetrahydrat	16 mM
Spermidin	0,4 mM
ATP	1,2 mM
GTP	0,25 mM
DTT	4 mM
HEPES-KOH (pH 7,8)	30 mM

Farmerscher Abschwächer

25 ml Lösung A	25 g Kaliumhexacyanidoferrat(III) in 500 ml Aqua dest.
25 ml Lösung B	50 g Natriumthiosulfat in 500 ml Aqua dest.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den folgenden Personen meinen besonderen Dank aussprechen.

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Baukrowitz, ohne den diese Doktorarbeit nicht zustande gekommen wäre. Vielen Dank für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe Baukrowitz und die Unterstützung bei dieser Arbeit!

Ich danke weiterhin Marianne Musinszki für die exzellente Betreuung im Labor, die zahlreichen Tipps und Anregungen, sowie für die unendliche Geduld und Hilfsbereitschaft.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern der AG Baukrowitz und des Physiologischen Instituts für die Hilfestellung im Labor, ein allzeit offenes Ohr und die unglaublich freundliche Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken. Ich danke euch für eure Unterstützung während der Promotionszeit, eure stets offenen Türen und Ohren und euren Glauben an mich!