

# Assemblierung und Pharmakologie von spannungsabhängigen KCNQ (Kv7) K<sup>+</sup> Kanälen



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

Ausgeführt am Biochemischen Institut in der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Christian Beimgraben

Kiel, im Mai 2007

Referent/in:.....  
Korreferent/in:.....  
Tag der mündlichen Prüfung:.....  
Zum Druck genehmigt, Kiel,.....

Der Dekan

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen .....	IV
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Aufbau und Funktion von Membranen .....	1
1.2 Transport durch Membranen .....	1
1.3 Allgemeiner Aufbau von Ionenkanälen.....	2
1.4 Spannungsabhängige Ionenkanäle .....	4
1.5 Kaliumkanäle.....	8
1.6 KCNQs (Kv7.1 – Kv7.5) - eine Familie spannungsabhängiger Kaliumkanäle.....	11
1.7 Assemblierung von spannungsabhängigen KCNQ Kaliumkanälen.....	15
1.8 Pharmakologische Einflüsse auf die Familie der spannungsabhängigen KCNQ Kanäle.....	18
1.9 Fragestellung.....	20
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1 Material .....	22
2.1.1 Geräte .....	22
2.1.2 Verbrauchsmaterial .....	23
2.1.3 Chemikalien .....	24
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	24
2.1.5 Oligonukleotide.....	25
2.1.6 Bakterienstämme.....	28
2.1.7 Bakteriennährmedium.....	28
2.1.8 Eukaryotische Zellkulturen.....	28
2.1.9 Eukaryotische Zellkulturmedien .....	29
2.1.10 Plasmide .....	29
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	33
2.2.1.1 Verwendung von mikrobiologischen Organismen.....	33
2.2.1.2 Plasmidpräparationen .....	34
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	35
2.2.2.1 DNA Techniken .....	35
2.2.2.2 PCR Techniken .....	39
2.2.2.3 RNA Techniken.....	45
2.2.3 Biochemische Methoden .....	46
2.2.3.1 Membranpräparationen .....	46
2.2.3.2 Experimente zur Interaktion von Proteinen .....	47
2.2.3.3 Experimente zur Modifikation von Proteinen.....	51
2.2.3.4 Analytische Verfahren zur Charakterisierung von Proteinen .....	53
2.2.3.5 Nachweis von Proteinen.....	57

<b>2.2.4 Immunologische Methoden .....</b>	<b>58</b>
2.2.4.1 Gewinnung von Antikörpern.....	58
<b>2.2.5 Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>59</b>
2.2.5.1 Verwendung von eukaryotischen Zellkulturen .....	59
<b>2.2.6 Elektrophysiologische Methoden .....</b>	<b>62</b>
2.2.6.1 Verwendung von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	62
2.2.6.2 Auswertung elektrophysiologischer Experimente .....	63
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>66</b>
<b>3.1 Charakterisierung der untereinheitenspezifischen Wechselwirkungsdomäne (si-Domäne) von spannungsabhängigen KCNQ Kanälen .....</b>	<b>66</b>
<b>3.1.1 Untersuchungen über die Funktion der si-Domäne von KCNQ3 anhand von Deletionsmutanten.....</b>	<b>66</b>
<b>3.1.2 Untersuchungen zur Assemblierung von KCNQ2 und KCNQ3 anhand von durch Punktmutation veränderten KCNQ Kanälen .....</b>	<b>68</b>
<b>3.1.3 Elektrophysiologische Untersuchungen zur Funktion der beiden untereinheitenspezifischen Wechselwirkungsdomänen TCC1 und TCC2 von KCNQ3 anhand von KCNQ1 und KCNQ3 Chimären .....</b>	<b>71</b>
<b>3.1.4 Effekt der dominant negativen Porenmutation von KCNQ1 auf die mit KCNQ2 koinjizierten Chimären von KCNQ1 und KCNQ3 .....</b>	<b>75</b>
<b>3.1.5 Relative Oberflächenexpression der KCNQ1/KCNQ3 Chimären .....</b>	<b>76</b>
<b>3.1.6 Koimmunpräzipitationsexperimente von KCNQ2 mit den Chimären von KCNQ1 und KCNQ3 .....</b>	<b>78</b>
<b>3.1.7 Untersuchungen zur Funktion und Positionierung der super-spiralisierten Tetramerisierungsdomäne TCC2 am Beispiel von KCNQ2.....</b>	<b>81</b>
<b>3.1.8 Untersuchungen zur si-Domäne von KCNQ2 anhand rekombinanter Proteine aus <i>E.coli</i> .....</b>	<b>83</b>
<b>3.1.9 Experimente zur Vernetzung der Wechselwirkungsdomäne von KCNQ2 mit rekombinantem Protein aus <i>E.coli</i>.....</b>	<b>88</b>
<b>3.1.10 Experimente zur N-Glykosylierung von KCNQ1 .....</b>	<b>91</b>
<b>3.1.11 Untersuchungen zur putativen Protein Kinase A (PKA) abhängigen Phosphorylierung von KCNQ5 .....</b>	<b>95</b>
<b>3.1.12 <i>In vitro</i> Phosphorylierungsexperimente zur Protein Kinase A (PKA) abhängigen Modifikation von KCNQ5 .....</b>	<b>98</b>
<b>3.2 Charakterisierung polyklonaler Antikörper gegen KCNQ2 und KCNQ3 aus Kaninchen .....</b>	<b>100</b>
<b>3.3 Einfluss der Porenregion von KCNQ1 (PQ1) und des C-Terminus von KCNQ3 (CTQ3) auf die resultierenden Ströme von KCNQ2, KCNQ4 und KCNQ5 .....</b>	<b>105</b>
<b>3.3.1 Untersuchungen zur stromverstärkenden Wirkung der Porenregion von KCNQ1 (PQ1) und des C-Terminus von KCNQ3 anhand von KCNQ4 Chimären.....</b>	<b>105</b>
<b>3.3.2 Untersuchungen zur Strom verstärkenden Wirkung der Porenregion von KCNQ1 (PQ1) anhand von KCNQ2 und KCNQ5 Chimären .....</b>	<b>110</b>
<b>3.3.3 Vergleichende Untersuchungen zur Expression von KCNQ1 und KCNQ5 in COS-7 Zellen .....</b>	<b>114</b>

3.3.4	Untersuchungen zur Strom erniedrigenden Wirkung der Turret Domäne und des C-Terminus von KCNQ3 (TDQ3) anhand von Chimären mit KCNQ1.....	116
3.4	Pharmakologische Untersuchungen zur Wirkung von R-L3 auf die Familie der spannungsabhängigen KCNQ Kanäle.....	119
3.4.1	Untersuchungen zur Interaktion von KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 und KCNQ5 mit dem Benzodiazepin R-L3.....	119
4.	Diskussion.....	124
4.1	Assemblierung von spannungsabhängigen KCNQ Kaliumkanälen.....	124
4.1.1	Untersuchungen zur si-Domäne spannungsabhängiger KCNQ Kanäle...	124
4.1.2	Funktion der zweiten coiled coil Domäne spannungsabhängiger KCNQ Kanäle.....	126
4.1.3	Funktion der ersten coiled coil Domäne spannungsabhängiger KCNQ Kanäle.....	128
4.1.4	Quervernetzungsexperimente zur Untersuchung der Homotetramerisierung von KCNQ2 .....	129
4.1.5	Multimerisierung von KCNQ Kanälen nach Aufhebung der coiled coil Domänen .....	131
4.1.6	N-Glykosylierung von KCNQ1 .....	133
4.1.7	Putative PKA abhängige Phosphorylierung von KCNQ5.....	135
4.2	Polyklonale Antikörper gegen KCNQ2 und KCNQ3 .....	142
4.2.1	Charakterisierung polyklonaler Antikörper gegen das humane KCNQ2 und KCNQ3 .....	142
4.3	Pharmakologische Untersuchungen spannungsabhängiger KCNQ Kanäle .....	144
4.3.1	Wirkung von R-L3 auf KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 und KCNQ5.....	144
4.4	Ausblick.....	146
5.	Zusammenfassung.....	148
6.	Summary .....	149
7.	Literatur .....	151
8.	Veröffentlichungen.....	164
	Eidesstattliche Erklärung.....	164
	Lebenslauf .....	165
	Danksagung.....	166

## Abkürzungen

$\Omega$	Ohm (SI-Einheit für den elektrischen Widerstand)
$\mu$	micro
A	Ampere (SI-Einheit für den elektrischen Strom)
Å	Ångström ( $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m} = 100 \text{ pm}$ )
ADAM	Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen
ATP	Adenosintriphosphat
BFNC	Benign familial neonatal convulsion
BSA	Rinderserumalbumin
BTB/POZ	broad complex Tram-track bric-a-brac/Pox virus and zinc finger
c	centi
$\text{Ca}^{2+}$	Kalziumion
cAMP	zyklisches Adenosintriphosphat
$\text{Cav}$	spannungsabhängige Kalziumkanäle
CHO	Ovarzellen des chinesischen Hamsters
Ci	Curie (SI-Einheit für die Radioaktivität)
CIAP	Alkalische Phosphatase aus dem Darm von Kälbern
$\text{Cl}^-$	Chloridion
$\text{CO}_2$	Kohlendioxid
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Disuccinimidylsuberate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAG	ether a go-go
Endo H	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	Latein: et alii (und andere)
g	Gramm (SI-Einheit für das Gewicht)
h	Stunden
HERG	human ether a go-go related
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
IUPHAR	International Union of Pharmacology
JLNS	Jervell- und Lange-Nielson-Syndrom
K	Kelvin
k	kilo
$\text{K}^+$	Kaliumion
$\text{K}_{\text{IR}}$	<i>inward rectifying</i> (einwärts gleichrichtende) Kaliumkanäle
KoIP	Koimmunpräzipitation
$\text{Kv}$	spannungsabhängige Kaliumkanäle
l	Liter
Lamp2a	Lysosomen assoziiertes Membranprotein 2a
$\text{LB}_0$	Luria Bertani
LTQ	Long-QT Syndrome
$\text{m}^{(1)}$	Meter <sup>(1)</sup>

## ABKÜRZUNGEN

---

<b>m</b> <sup>(2)</sup>	mili <sup>(2)</sup>
<b>M</b>	molar
<b>MilliQ</b>	reinstes (doppelt entsalztes) Wasser
<b>min</b>	Minuten
<b>mRNA</b>	Boten-Ribonukleinsäure
<b>M-Strom</b>	Muskarin abhängiger Strom von KCNQ2/KCNQ3
<b>n</b>	nano
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natriumion
<b>Nav</b>	spannungsabhängige Natriumkanäle
<b>N-Terminus</b>	Aminoterminus
<b>NTP</b>	Desoxyribonukleotidtriphosphat
<b>p</b>	pico
<b>P</b>	Pore
<b>p.A.</b>	pro Analysis
<b>PBS</b>	Phosphatpuffer (Phosphate buffered saline)
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>PF3</b>	Chaperone Co-Faktor Prefoldin
<b><i>Pfu</i></b>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<b>pH</b>	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
<b>PKA</b>	Protein Kinase A
<b>PKC</b>	Protein Kinase C
<b>PNaseF</b>	N-Glykosidase F
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>R-L3</b>	[L-364,373 [(3-R)-1, 3-dihydro-5-(2-fluorophenyl)-3-(1H-indol-3-ylmethyl)-1-methyl-2H- 1,4-benzodiazepin-2-one]
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RWS</b>	Romano-Ward Syndrom
<b>S</b>	Segment
<b>s</b>	Sekunde
<b>SCG</b>	superiorcervicalganglische Neuronen
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SGK1</b>	Serum und Glucocorticoid induzierbare Kinase
<b>si-Domäne</b>	subunit interaction domain
<b>TAE</b>	Tris EDTA Essigsäurepuffer
<b><i>Taq</i></b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBS</b>	Tris gepufferte Kochsalzlösung
<b>TBST</b>	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20
<b>TCC-Domäne</b>	Tetramerisierungsdomäne (TCC = tetramerizing coiled coil)
<b>TD</b>	Turmdomäne (turret domain)
<b>TEA</b>	Tetraethylammonium
<b>TEVC</b>	Zwei-Elektroden- Spannungsklemmen-Methode
<b>TIM</b>	Translokase der inneren Mitochondrienmembran
<b>TM</b>	Transmembrandomäne
<b>TOM</b>	Translokase der äußeren Mitochondrienmembran
<b>TRP Kanäle</b>	Transiente Rezeptor Potential Kanäle
<b>U</b>	Unit (Maßeinheit für die Aktivität von Enzymen)
<b>Upm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>UV</b>	ultraviolett
<b>V</b>	Volt (SI-Einheit für die elektrische Spannung)
<b>w/v</b>	Volumen pro Gewicht

v/v  
 $\alpha$                       Volumen pro Volumen  
anti

**Aminosäuren:**

<b>Alanin</b>	Ala	A
<b>Arginin</b>	Arg	R
<b>Asparagin</b>	Asn	N
<b>Asparaginsäure</b>	Asp	D
<b>Cystein</b>	Cys	C
<b>Glutamin</b>	Gln	Q
<b>Glutaminsäure</b>	Glu	E
<b>Glycin</b>	Gly	G
<b>Histidin</b>	His	H
<b>Isoleucin</b>	Ile	I
<b>Leucin</b>	Leu	L
<b>Lysin</b>	Lys	K
<b>Methionin</b>	Met	M
<b>Phenylalanin</b>	Phe	F
<b>Prolin</b>	Pro	P
<b>Serin</b>	Ser	S
<b>Threonin</b>	Thr	T
<b>Tryptophan</b>	Trp	W
<b>Tyrosin</b>	Tyr	Y
<b>Valin</b>	Val	V

**Desoxyribonukleinsäuren:**

<b>Adenin</b>	A
<b>Cytosin</b>	C
<b>Guanin</b>	G
<b>Thymin</b>	T



# 1. Einleitung

## 1.1 Aufbau und Funktion von Membranen

Membranen stellen eine Barriere zwischen dem Inneren einer Zelle und der äußeren Umgebung dar. Sie bestehen im einfachsten Fall aus einer doppelten Schicht an amphipathischen Phospholipiden, die wie die Moleküle einer Flüssigkeit frei untereinander verschiebbar und keinesfalls starr sind (Singer und Nicolson, 1972). Der hydrophile, polare Teil eines Phospholipids ist gegen das polare, wässrige Äußere gerichtet. Die hydrophoben gesättigten und ungesättigten Kohlenwasserstoffketten der Phospholipide hingegen sind gegen die unpolaren Kohlenwasserstoffe einer zweiten Phospholipidschicht gewandt, deren polares Ende, wiederum gegen das Innere der Zelle zeigt (Langner und Kubica, 1999).

Die Membranen höher organisierter Lebewesen, wie die der Eukaryoten sind oft komplexer aufgebaut, als die Membranen der Prokaryoten. Dies zeichnet sich beispielsweise in der Art der Zusammensetzung einer Vielzahl unterschiedlicher Membranbestandteile aus. So sind oft große Mengen an Cholesterin und Glykolipide wichtige Bausteine eukaryotischer Membranen und übernehmen dort eine bedeutende Funktion, beispielsweise in Form von *Lipid rafts*, wo die länger-kettigen Lipide zu einer erhöhten Ansammlung von Proteinen führen (Brown und London, 1998; Lee et al., 2001).

Insgesamt kommen den Membranen eine Fülle an unterschiedlichen Aufgaben zu, beispielsweise die Weiterleitung von elektrischen Impulsen über die äußere Membran von Sinneszellen, die auf der Besonderheit von Membranen beruht, geladene Teilchen nicht passieren zu lassen (Hille et al., 1999, Gouaux und MacKinnon, 2005).

## 1.2 Transport durch Membranen

Der Transport geladener Teilchen durch die äußere Zellmembran geschieht indirekt, nicht mittels Diffusion und durch eine Vielzahl an unterschiedlichen Mechanismen. Ionen und andere Substanzen können beispielsweise mit Hilfe von *Carriern* in energieaufwendigen Prozessen unter ATP-Verbrauch gegen ein Konzentrationsgefälle von der einen auf die entgegengesetzte Seite der Membran befördert werden (Apell, 2003).

*Carrier* sind spezialisierte Transporter in den Membranen der Zelle, die dem Transport von komplexen Molekülen, im Fall von ABC-Transportern beispielsweise Pharmazeutika, wie dem Antimalariamittel Chloroquin, dienen (Kuchler und Thorner, 1992). Man findet *Carrier*

sowohl in den äußeren Membranen der einfach organisierten Prokaryoten, als auch in den äußeren und inneren Membranen der Eukaryoten, wo sie ebenfalls eine Fülle unterschiedlichster Aufgaben wahrnehmen (Alberts et al., 2003). Ebenso erfolgt die Beförderung von Proteinen in die verschiedenen Kompartimente der eukaryotischen Zelle mit Hilfe von Transportern, beispielsweise durch *TIM* und *TOM*, zweier Translokasen der inneren und äußeren Plasmamembran der Mitochondrien höherer Lebewesen (Albrecht et al., 2006).

Der durch *Carrier* ermöglichte Transport durch Membranen muss dabei nicht nur wie im Fall der sogenannten Uniporter auf einen Stoff und eine Richtung begrenzt sein (Saier, 2000). Vielmehr befördern *Carrier* beim Transport einer Substanz oftmals parallel eine Zweite. Werden beide Stoffe gleichsam in dieselbe Richtung befördert, spricht man von einem Symport; beim gleichzeitig ablaufenden Transport in zwei unterschiedliche Richtungen hingegen von einem Antiport (Saier, 2000; Dahl et al., 2004). Einer der bekanntesten Antiporter ist die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Hierbei handelt es sich um einen auf Natriumionen und Kaliumionen spezialisierten *Carrier*, der mit zur Aufrechterhaltung neuronaler Reizleitung beiträgt, indem er gezielt unter Verbrauch eines Moleküls ATP drei Natriumionen aus dem Inneren der Nervenzelle nach Außen und zugleich zwei Kaliumionen aus dem der Zelle umgebenen Milieu in deren Inneres transportiert (Apell, 2003). Als Folge dieses gerichteten, energieaufwendigen Prozesses kommt es zur Entstehung eines elektrochemischen Gradienten, bei dem das Innere der Zelle negativ im Vergleich zu dem umgebenen Äußeren der Zelle geladen ist (Gouaux und MacKinnon, 2005).

*Carrier*, Transporter bzw. Translokasen übernehmen einen Großteil des Transports von Molekülen über die Membran. Sie sind jedoch nicht die einzigen Bestandteile der Zellmembran, die für die Beförderung von Substanzen in Betracht kommen. Eine zweite Gruppe stellen die Kanal und Poren bildenden Einheiten der Membranen dar, etwa wie im Fall der Aquaporine und der Ionenkanäle (Hille et al., 1999).

### **1.3 Allgemeiner Aufbau von Ionenkanälen**

Unterschiedliche *Carrier* und Ionenpumpen der Membran führen zur Bildung von Ionengradienten (Gouaux und MacKinnon, 2005). In der Tabelle 1 findet sich ein Überblick über die Verteilung der vier unterschiedlichen Ionen für Natrium ( $\text{Na}^+$ ), Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Kalium ( $\text{K}^+$ ) und Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ) innerhalb und außerhalb einer typischen Säugetierzelle wieder (Ashcroft, 2000).

Ion	Konzentration extrazellulär (mM)	Konzentration intrazellulär (mM)	Gleichgewichtspotential (mV)
Natrium	135 - 145	12	+66
Kalium	3,5 - 5	140	-93
Kalzium	2,25 - 2,52	$10^{-7}$	+135
Chlorid	115	2,5 - 50	-42

**Tabelle 1:** Übersicht über die Verteilung der Natrium-, Kalium-, Kalzium- und Chloridionenkonzentration nach ihrem Vorkommen in einer typischen Säugetierzelle nach Ashcroft, 2000. Die Konzentration an Natrium-, Kalzium-, und Chloridionen ist im extrazellulären Raum deutlich erhöht im Vergleich zur intrazellulären Ionenkonzentration. Im Gegensatz zur beschriebenen Verteilung an Natrium-, Kalzium- und Chloridionen ist das Vorkommen an Kaliumionen innerhalb einer Säugetierzelle deutlich gesteigert im Vergleich zu den nur wenig außerhalb der Säugetierzelle vorkommenden Kaliumionen. Mit Hilfe der *Nernst*-Gleichung lässt sich für Natrium-, Kalium-, Kalzium- und Chloridionen dasjenige Potential berechnen, bei dem zum einen ein Gleichgewicht zwischen den außerhalb und innerhalb der Zelle vorkommenden Ionen besteht, und darüber hinaus kein Nettostrom für die untersuchten Ionen zu beobachten ist.

So ist die Konzentration an  $\text{Na}^+$  außerhalb der Zellmembran einer Säugetierzelle um den Faktor zehn bis elf mal höher als die Konzentration im Inneren. Auch die Konzentration der  $\text{Cl}^-$  ist mit 115mM außerhalb der Zelle deutlich erhöht, im Gegensatz zur  $\text{Cl}^-$ -Konzentration innerhalb der Zelle mit nur 2,5mM bis 50mM. Dieselbe Tendenz konnte auch für  $\text{Ca}^{2+}$  beobachtet werden. Dort besteht außerhalb der typischen Säugerzelle eine Konzentration von 2,25mM bis 2,52mM hingegen im Inneren nur eine Konzentration von  $10^{-7}$ mM. Da viel mehr Natrium-, Chlorid- und Kalziumionen außerhalb der Säugerzelle vorliegen im Gegensatz zu den nur wenigen Ladungen der entsprechenden Ionen im Inneren, kommt es zur Bildung einer Potentialdifferenz. Für jedes Ion lässt sich diejenige Spannung  $E$  berechnen, bei der aufgrund des Ausgleichs der Nettoladungen kein Strom, weder von außen nach innen noch von innen nach außen, mehr zu beobachten ist. Dies geschieht mit Hilfe der in Abbildung 1.1 gezeigten und 1889 von dem deutschen Physiker Walther Nernst beschriebenen *Nernst*-Gleichung.

$$E = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{c_a}{c_i}$$

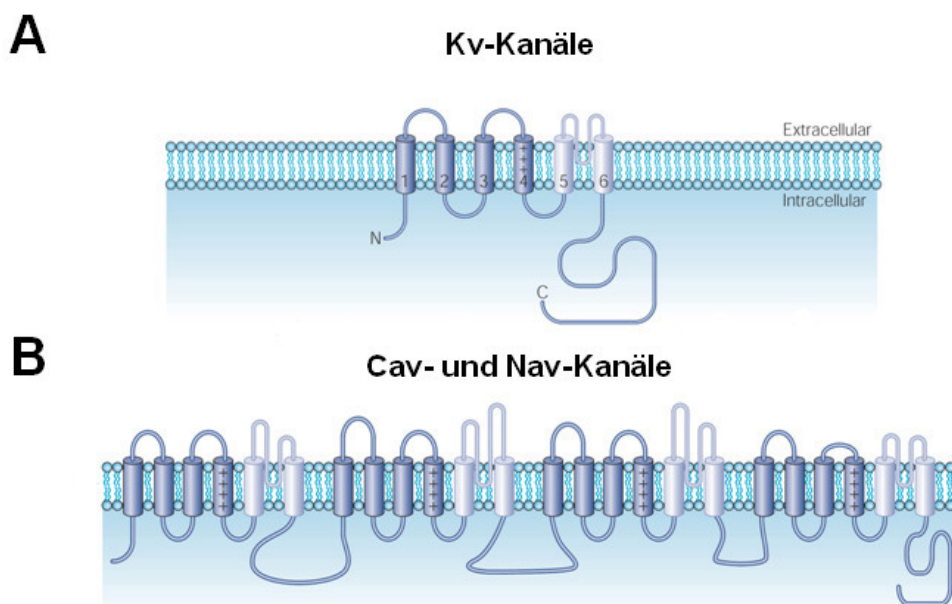
**Abbildung 1.1:** *Nernst*-Gleichung zur Berechnung des Gleichgewichtspotentials in mV.  $R$  die allgemeine Gaskonstante mit einem Wert von  $8,314\text{mJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ .  $T$  steht für die absolute Temperatur in Kelvin, bei einer Temperatur von  $20^\circ\text{C}$  mit einem Wert von umgerechnet  $293\text{K}$ .  $z$  bezeichnet die Valenzladung des zu untersuchenden Ions und  $F$  stellt die *Faraday*-Konstante mit einem Wert von  $96,500\text{A s mol}^{-1}$  dar. Die unterschiedliche Verteilung der zu untersuchenden Ionen wird durch die Werte für die Ionenkonzentration im Inneren  $C_i$  und außerhalb der Zelle  $C_a$  mit in die Formel einbezogen.

Das Gleichgewichtspotential ist demnach für Kalzium mit +135mV am höchsten. Das Ruhepotential für Natrium liegt bei +66mV, das für Chlorid hingegen nur bei -42mV. Ganz anders verhält sich die Verteilung der Kaliumionen. Kaliumionen sind nur gering außerhalb der Säugerzelle mit nur 3,5mM bis 5mM vorhanden. Dafür besteht aber meist im Inneren der Zellen mit bis zu 140mM ein Überschuss an Kaliumionen. Dieses führt mit -93mV zu einem sehr negativen Potential für Kaliumionen (Ashcroft, 2000).

Bei der Übertragung von Reizen über die äußere Membran von Nervenzellen kann es durch ein Öffnen von spannungsabhängigen Ionenkanälen kurzzeitig zu einer Veränderung der jeweiligen Ionenkonzentration an  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ , oder  $\text{K}^+$  kommen. Für einen Bruchteil von Sekunden passieren die Ionen die Membran mit einer wesentlich höheren Geschwindigkeit im Vergleich zu *Carriern* entsprechend des Konzentrationsgradienten, bis die Kanäle spontan schließen. Spezifische Carrier sorgen dann für ein Einstellen des ursprünglichen Zustands. Ionenkanäle sind somit Schleusen in der Membran.

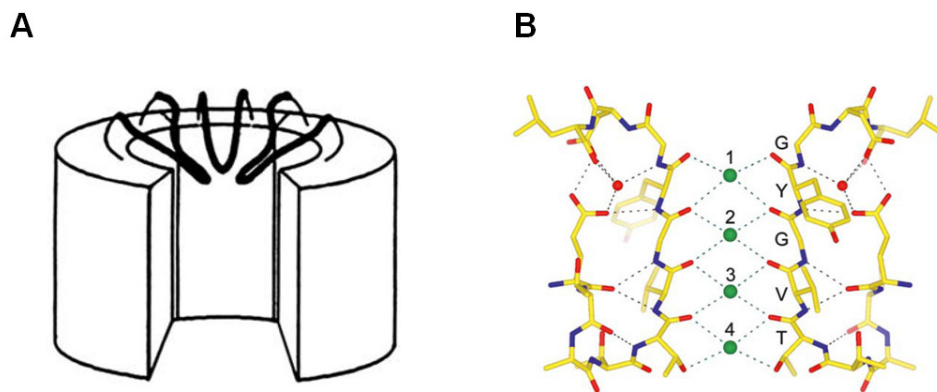
## 1.4 Spannungsabhängige Ionenkanäle

Die unterschiedlichen spannungsabhängigen Ionenkanäle ähneln sich erheblich im Aufbau, was auf einen gemeinsamen Ursprung schließen lässt (Hille et al., 1999). Oft handelt es sich um ein Zusammenwirken von vier oder fünf Kanaluntereinheiten, welche die Membran in



**Abbildung 1.2: Unterschiedliche spannungsabhängige Kaliumkanäle nach Swartz et al., 2004.** (A) Schematische Darstellung spannungsabhängiger 6TM/1P Kaliumkanäle. Jeweils vier Untereinheiten bilden einen Kanal. (B) Aufbau spannungsabhängiger Natrium- und Kalziumkanäle mit einer 24TM/4P Struktur. Dabei ist nur eine Untereinheit für die Bildung eines vollständigen Kanals erforderlich.

einer Abfolge von sechs oder auch mehr Transmembranhelices durchspannen und eine trichterförmige dreidimensionale Struktur bilden, in deren Inneren sich die sogenannte Porenregion, auch als Porenschleife mit Selektivitätsfilter bezeichnet, befindet (Yellen, 2002; Ahern und Horn, 2004). Die Abbildung 1.2 gibt einen Überblick über den Aufbau verschiedener spannungsabhängiger Ionenkanäle. Die Porenregion liegt bei den spannungsabhängigen Ionenkanälen zumeist in dem Bereich zwischen dem fünften und dem sechsten Transmembransegment S5 und S6 (MacKinnon, 2003). Sie ist deutlich anhand der hoch konservierten Aminosäuresequenz bei Sequenzvergleichen zwischen Kanälen ein- und derselben Familie, aber auch für Familien anderer Ionenkanäle zu erkennen (Durell et al., 1998; Ahern und Horn, 2004). So lautet die Aminosäuresequenz des Selektivitätsfilters für die Mehrheit der Kaliumkanäle (T/S)<sub>xx</sub>TxGYG mit x als beliebiger Aminosäure wie am Beispiel der Kaliumkanäle vom *Shaker*-Typ gezeigt wurde (Heginbotham et al., 1992a; Hille, 2001).



**Abbildung 1.3: Überblick über den Selektivitätsfilter von spannungsabhängigen Kaliumkanälen nach MacKinnon, 2004.** (A) Schematische Darstellung eines spannungsabhängigen Kaliumkanals von *Shaker*-Typ. In der Mitte befindet sich die Porenschleife, welche die engste Stelle eines Kanals -den Selektivitätsfilter- ausmacht und an deren Carbonylgruppen die Hydrathülle der  $K^+$  abgestreift werden. (B) Schematische Darstellung des Selektivitätsfilters von *Streptomyces lividans* mit den für den Selektivitätsfilter wichtigen Aminosäuren GYGVT. In rot sind die Sauerstoffatome, in blau Stickstoffatome, in gelb das Kohlenstoffgerüst der Aminosäuren im Selektivitätsfilter dargestellt. Die möglichen Positionen der  $K^+$  sind in grün abgebildet, grün gestrichelt sind die auf das jeweilige  $K^+$  wirkenden Sauerstoffatome aus den Carbonylgruppen der zum Selektivitätsfilter gehörenden Aminosäuren. Die grau gestrichelten Linien stehen für Wasserstoffbrückenbindungen.

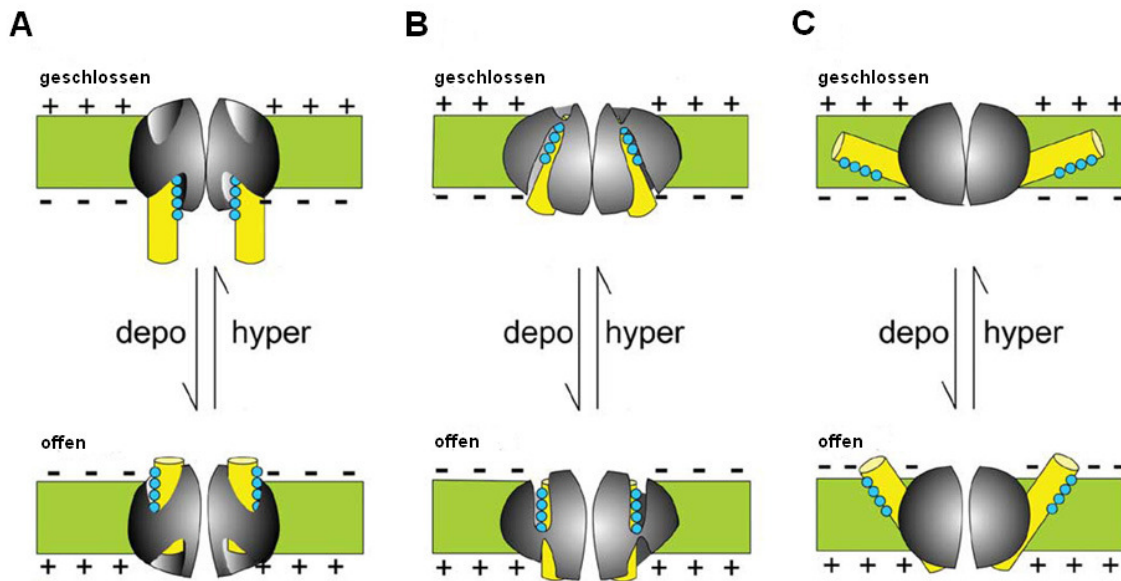
Die Abbildung 1.3 gibt einen Überblick über den Selektivitätsfilter von spannungsabhängigen Kaliumkanälen. Einige Kanäle weisen statt des Tyrosinrestes (Y) auch einen Phenylalaninrest (F) im Bereich der Porenschleife auf. Eine Deletion des Tyrosin- oder Glycinrestes und eine Veränderung der Aminosäureabfolge im Bereich der Porenschleife hat einen dominant negativen Effekt auf die Kanäle zur Folge und führt zu deren Funktionsverlust (Seeböhm et al., 2001; Seeböhm et al., 2005b). Der Selektivitätsfilter stellt die engste Stelle innerhalb der Kanäle dar. Hier werden an den Carbonylgruppen der Seitenketten des GYG-Motivs der Porenregion die Hydrathüllen der einzelnen Ionen abgestreift, wie für den bakteriellen

Kaliumkanal KcsA von *Streptomyces lividans* gezeigt werden konnte (Doyle et al., 1998). Dabei ist der Abstand der Carbonylgruppen im Bereich des Selektivitätsfilters für die einzelnen Ionenkanäle von entscheidender Bedeutung (Gouaux und MacKinnon, 2005). Natriumionen (1,9Å) können, obwohl sie deutlich kleiner als Kaliumionen (2,66Å) sind, Kaliumkanäle nicht passieren (MacKinnon, 2004). Natriumionen besitzen aufgrund der höheren Elektronegativität eine größere Hydrathülle als Kaliumionen. Mit intakter Hydrathülle ist aber das eigentlich kleinere Natriumion erheblich zu groß, um die Pore der Kaliumkanäle zu passieren (Doyle et al., 1998). Die Carbonylgruppen des Selektivitätsfilters verdrängen jedoch aufgrund der geringeren Größe der Natriumionen im Vergleich zu den Kaliumionen nicht die Hydrathülle der Natriumionen. Ohne die ladungskompensierende und abschirmende Funktion der Carbonylgruppen können die Natriumionen deshalb nicht durch die Pore geleitet werden.

Ionenkanäle sind, wie am Beispiel der Kaliumkanäle beschrieben, daher meist selektiv für die zugehörigen Ionen. Dennoch können aber auch weitere Ionen wie Titanium, Rubidium, Ammonium und Cäsium in abnehmender Reihenfolge Kaliumkanäle passieren, wie für diverse Kaliumkanäle gezeigt werden konnte (Heginbotham und MacKinnon, 1993; LeMasurier et al., 2001; Prole und Marrion, 2004).

Im Bereich des vierten Transmembransegments S4 befindet sich der sogenannte Spannungssensor (Blaustein und Miller, 2004). Dieser zeichnet sich durch ein verstärktes Auftreten an den positiv geladenen Aminosäuren aus (Miraglia del Giudice et al., 2000; Tombola et al., 2005). Durch die Depolarisation der Membran wird der Spannungssensor weniger von den umliegenden Membranhelices der Kanaluntereinheit abgeschirmt.

Nach dem kontrovers diskutierten Paddelmodell verändert der Spannungssensor in S4 vermutlich seine Position nach außerhalb an den Rand des Kanals, indem er wie das Paddel eines Ruderbootes aus dem intrazellulären Bereich in den extrazellulären Raum angehoben werden kann, wobei gleichzeitig eine Konformationsänderung innerhalb des Kanals einhergeht und dieser daher von einem geschlossenen in einen offenen Zustand überführt wird (Jiang et al., 2003; Sigworth, 2003). Dieses Modell beruht auf der Kristallstruktur des archaellen KvAP Kanals von *Aeropyrum pernix* nach Jiang et al., 2003 (Abbildung 1.4C). Demnach befindet sich der Spannungssensor mit dem vierten Transmembransegment intrazellulär. Durch ein Helix-Turn-Helix Motiv zwischen dem dritten und vierten Transmembransegment S3 und S4 kommt es zur Gestaltung des sogenannten Paddels. Jedoch könnten Wechselwirkungen zwischen dem zur Kristallisation des Kanals verwendeten Antikörpers mit flexiblen Bereichen innerhalb des Proteins zu dessen Verformung geführt



**Abbildung 1.4: Drei verschiedene Modelle für den Spannungssensor spannungsabhängiger Ionenkanäle nach Bezanilla et al., 2005.** (A) *Helical screw model* nach Durell et al., 1992. (B) Transportermodell nach Bezanilla et al., 2002; Starace und Bezanilla, 2004. (C) Das für KvAP-Kanäle von der Arbeitsgruppe um Rodderick MacKinnons postulierte Paddelmodell für den Spannungssensor spannungsabhängiger Kaliumkanäle (Jiang et al., 2003). Der Spannungssensor mit dem vierten Transmembransegment S4 ist in gelb dargestellt, die ersten vier positiv geladenen Aminosäuren für den Spannungssensor hingegen sind in hellblau hervorgehoben. Der restliche Kanal wird dabei nur schematisch in grau angedeutet. Die Lipiddoppelschicht der Membran wurde vereinfacht als verstärkt grün markierter Bereich abgebildet. Die positiven (+) und negativen (-) Ladungen geben einen zusätzlichen Hinweis über die Polarisation der Membran.

haben, so dass das Paddelmodell möglicherweise nicht dem nativen Zustand entspricht (Swartz, 2004). Daneben sind aber noch weitere Modelle bekannt, wie ebenfalls in Abbildung 1.4 veranschaulicht.

Bei dem sogenannten Transportermodell nach Starace und Bezanilla (2004), befindet sich der Spannungssensor für die spannungsabhängigen Shaker-Kanäle im geschlossenen Zustand in einer mit Wasser und Protonen gefüllten Spalte in der Membran, die nach intrazellulär geöffnet ist, wie in Abbildung 1.4 (B) gezeigt. Bei der Depolarisation der Membran wird der Spannungssensor durch Biegen in eine aufrechte Position gestellt, wobei die mit Wasser gefüllte Spalte in ihrer Position verändert und bis zum Schließen des Kanals nach extrazellulär geöffnet ist.

Bei dem sogenannten *Helical screw model* nach Durell et al., 1992 hingegen erfolgt durch die Depolarisation der Membran eine helikale Rotationsbewegung des Spannungssensors, ähnlich der Drehbewegung einer Schraube, wobei dieser im geöffneten Zustand bis in den extrazellulären Raum hinaus befördert wird. Hingegen kommt es bei der Repolarisation der Membran wieder zu einer Verlagerung des Spannungssensors weit in den intrazellulären Bereich hinein, gleichzeitig erfolgt durch die Konformationsänderung ein Schließen des Kanals (Abbildung 1.4A). Das ursprüngliche *Helical screw model* beschreibt die Ausbildung

von Salzbrücken zwischen Aspartat und Glutamatresten, die vor der Rotation des Spannungssensors getrennt werden müssen (Durell et al., 1992). Neuere Erkenntnisse deuten jedoch darauf hin, dass sich der Spannungssensor ähnlich dem Transportermodell in einer mit Wasser gefüllten Aussparung innerhalb der Membran befindet (Gandhi und Isacoff, 2002; Ahern und Horn, 2004; Durell et al., 2004).

## 1.5 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind nach ihrem Vorkommen für nahezu alle tierischen Lebensformen beschrieben, wo sie beispielsweise in Form spannungsabhängiger Kaliumkanäle für die Hyperpolarisation und Repolarisation der Nervenzellen verantwortlich sind (Terlau und Stühmer, 1998; Shieh et al., 2000; Delmas und Brown, 2005). Darüber hinaus sind die sehr früh in der Evolution hervorgegangenen Kaliumkanäle ebenfalls für die beiden Reiche der Bakterien und der Archaeen nachgewiesen, wo sie eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Ionenhaushaltes übernehmen (Milkman, 1994; Doyle et al., 1998; Jiang et al., 2003). Unter den Eukaryoten sind die Kaliumkanäle nicht nur für die tierischen Vertreter, sondern ebenfalls für die Fülle von Pflanzen charakterisiert worden, wo Kaliumkanäle vom *Shaker*-Typ sowohl die wichtigen Funktionen der Reizleitung, als auch der Osmoregulation der Vakuolen und der Steuerung des Wasserhaushaltes über die Stigmata übernehmen (Gambale und Uozumi, 2006).

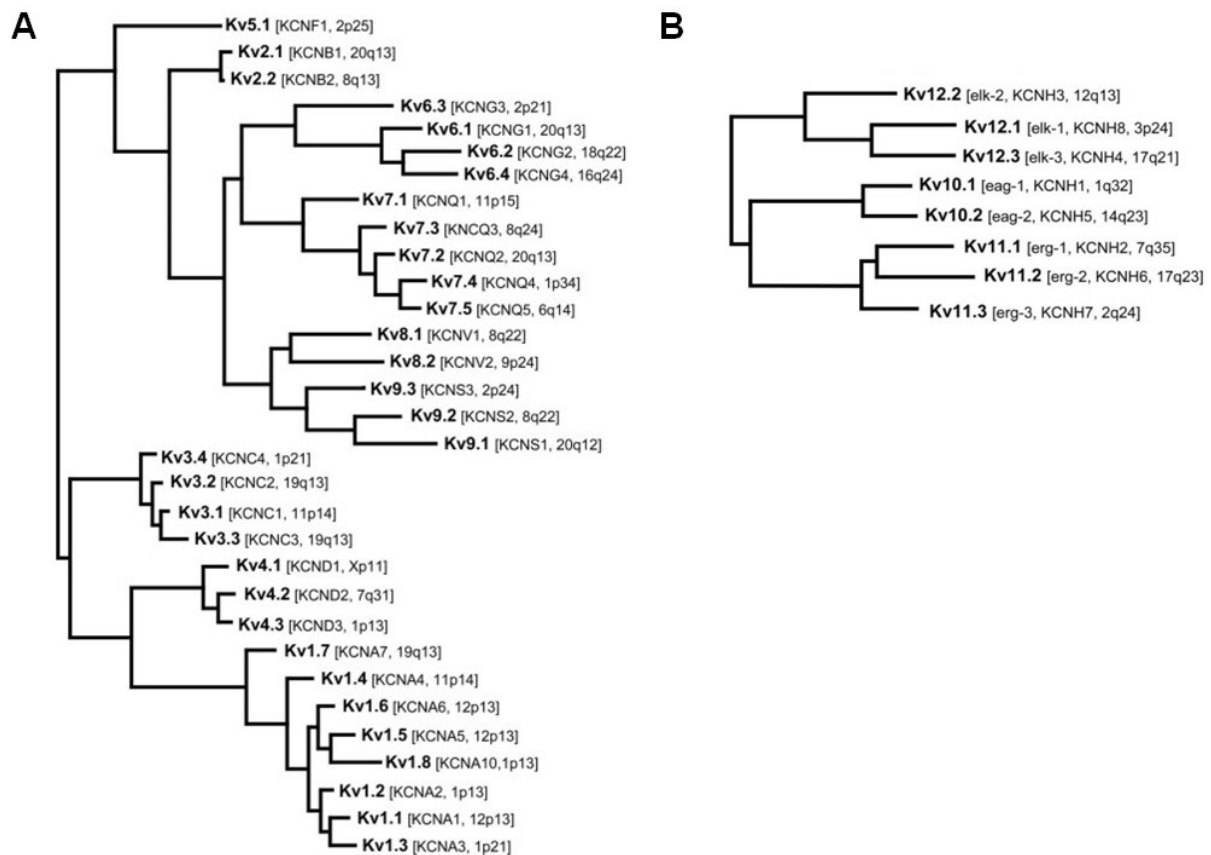
Bei den ersten klonierten Kaliumkanälen handelt es sich um spannungsabhängige Kaliumkanäle aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, die der Familie der *Shaker*-Kanäle zugeordnet werden konnten (Kamb et al., 1987). Derzeit sind über einhundert porenbildende  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten von Kaliumkanälen kloniert und beschrieben (Gutman et al., 2005).

Im Aufbau und in der Funktion ähneln sich die unterschiedlichen Familien sehr stark, zeigen aber zum Teil signifikante Unterschiede bei der Erregbarkeit und der Sensitivität in Bezug auf Pharmazeutika. Meist bestehen die  $\alpha$ -Untereinheiten aus sechs Transmembrandomänen (TM) mit einer Porenregion (P) kurz 6TM/1P, wie der Aufbau der spannungsabhängigen Kaliumkanäle vom *HERG*- (aus dem englischen für *human ether a go-go related*), *EAG*- (aus dem englischen für *ether a go-go*) und *KCNQ*-Typ zeigen, wobei jeweils vier  $\alpha$ -Untereinheiten miteinander einen funktionstüchtigen Kanal bilden (Yellen, 2002). Diese können entweder durch Homotetramerisierung von vier gleichen oder durch Hetero-



tetramerisierung von unterschiedlichen  $\alpha$ -Untereinheiten entstehen. Daneben üben die sogenannten  $\beta$ -Untereinheiten oftmals zusätzliche Aufgaben aus, indem sie mit den  $\alpha$ -Untereinheiten kooperieren und entweder die Funktion dieser unterstützen oder auch inhibieren können (Sanguinetti et al., 1996; Cheng und Kodama, 2004; Strutz-Seebohm, 2006; Wu et al., 2006;). Im Aufbau der Kaliumkanäle gibt es neben den häufig beschriebenen Kanaluntereinheiten mit insgesamt sechs Transmembrandomänen und einer Porenregion auch solche, die nur aus lediglich einer, oder aber auch aus zwei und mehr Transmembrandomänen bestehen. Entsprechend erfolgte die systematische Einordnung in unterschiedliche Familien. Beispielsweise handelt es sich bei dem für *Streptomyces lividans* beschriebenen Kaliumkanal KcsA um einen 2TM/1P Kanal (Gambale und Uozumi, 2006).

Die weitaus größte Gruppe innerhalb der Kaliumkanäle übernehmen die sogenannten spannungsabhängigen Kaliumkanäle mit über siebzig beschriebenen Loci bei den Säugern



**Abbildung 1.5: Systematische Einteilung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle nach Gutman et al., 2005.** Die phylogenetische Einteilung erfolgt derzeit in zwei unabhängig voneinander aufgestellten Dendrogrammen. (A) zeigt den Stammbaum für die spannungsabhängigen Kaliumkanäle Kv1.1 bis Kv9.3 nach IUPHAR, vom englischen für „*International Union of Pharmacology*“, sowie die ursprüngliche Benennung nach HGNC, vom englischen „*HUGO Gene Nomenclature Committee*“. Daneben sind die Loci der Chromosomen für das humane Genom angegeben. Die Erstellung des Stammbaums erfolgte unter Verwendung der CLUSTALW Analyse (Thompson et al., 1994) durch den Sequenzvergleich der hydrophoben Proteinbestandteile für den Bereich der ersten Transmembrandomäne S1 bis zur sechsten Transmembrandomäne S6. (B) zeigt den Stammbaum für die spannungsabhängigen Kaliumkanäle Kv10.1 bis Kv12.3, sowie die Loci der zugehörigen Chromosomen.

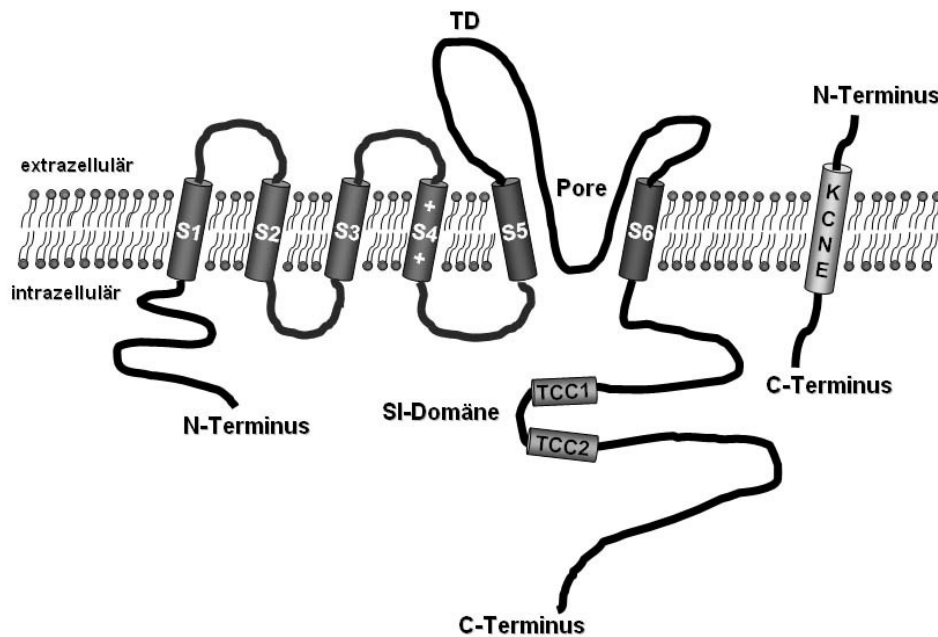
und über vierzig bekannten Genen im menschlichen Genom (Gutman et al., 2005). Ihre Einteilung erfolgt nach *IUPHAR*, vom englischen für „*International Union of Pharmacology*“ in Kv1 bis Kv12. Das „v“ stammt vom englischen für „*voltage-gated potassium channel*“. Daneben existiert die ältere Benennung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle nach *HGNC*, vom englischen „*HUGO Gene Nomenclature Committee*“, mit Bezeichnungen wie KCNA1-10 für Kv1.1-1.10 oder KCNH1 für Kv10.1, ehemals auch EAG1 (Gutman et al., 2005). Die Abbildung 1.5 gibt einen Überblick über die Systematik spannungsabhängiger Kaliumkanäle mit den derzeit zwölf bekannten Familien. Neben den spannungsabhängigen Kaliumkanälen werden drei weitere Gruppen von Kaliumkanälen unterschieden. Die erste Gruppe sind die durch Kalzium aktivierten Kaliumkanäle, wie  $K_{Ca}1-8$  (Gutman et al., 2005). Außer  $K_{Ca}1$  mit insgesamt sieben Transmembransegmenten und einem extrazellulären N-Terminus, zeichnen sich diese Kalzium aktivierten Kaliumkanäle durch eine 6TM/1P Struktur aus.  $K_{Ca}1$  kann auch spannungsabhängig aktiviert werden.

Die zweite Gruppe sind die einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle, wie KCNJ auch  $K_{IR}$  benannt aus dem englischen für „*inward rectifying*“. Insgesamt sieben Familien sind derzeit bekannt (Kubo et al., 2005). Entgegen der meisten Kaliumkanäle leiten diese 2TM Kanäle die Kaliumionen nur geringfügig von Innen nach Außen, öffnen vielmehr umgekehrt und sorgen so für einen einwärts gerichteten Kaliumstrom. Bei einem Membranpotential, das negativer als das Gleichgewichtspotential des Kaliums (-93mV) ist, leiten die  $K_{IR}$ -Kanäle von Außen nach Innen. Bei einem Membranpotential, das positiver als das Gleichgewichtspotential von Kalium ist, lassen die  $K_{IR}$ -Kanäle einen leichten nach auswärts gerichteten Strom zu, wobei die Höhe der Amplitude bei positiver werdendem Membranpotential jedoch abnimmt. Diese Besonderheit beruht auf der Tatsache, dass  $K_{IR}$ -Kanäle durch intrazelluläres  $Mg^{2+}$ , sowie durch das Polyamin Spermin<sup>4+</sup>, welche an die M2 Transmembrandomäne innerhalb der Pore binden, blockiert werden (Doupnik et al., 1995; Nichols und Lopatin, 1997). Bei der Depolarisation von Nervenzellen sind die gleichrichtenden Kaliumkanäle größtenteils geschlossen (Reimann und Ascroft, 1999).

Die letzte Gruppe der Kaliumkanäle umfasst die Tandem-Poren Kanäle mit insgesamt fünfzehn Untergruppen (Goldstein et al., 2005). Diese zeichnen sich entweder durch vier oder auch acht Transmembrandomänen mit jeweils zwei dazwischen liegenden Porenschleifen aus. Ein funktionsfähiger Kanal besteht jeweils aus einem Dimer. Zu ihnen gehören Kaliumkanäle vom *KCNK*-Typ. Für die Tandem-Poren Kanäle ist ein Leckstrom an Kaliumionen charakteristisch. Der auswärts gerichtete Strom an Kaliumionen übertrifft dabei den einwärtsgerichteten Kaliumstrom (Goldstein et al., 2001).

## 1.6 KCNQs (Kv7.1 – Kv7.5) - eine Familie spannungsabhängiger Kaliumkanäle

KCNQs (*HGNC*) oder auch Kv7 Kanäle (*IUPHAR*) werden in fünf  $\alpha$ -Untereinheiten KCNQ1 (Kv7.1) bis KCNQ5 (Kv7.5) unterteilt. Das K in KCNQ steht für die Kaliumionen, die diese Kanäle hauptsächlich passieren. Das CN in KCNQ ist eine Kurzform für die englische Bezeichnung „channel“ für Kanäle im Allgemeinen. Das Q steht für die zuerst mit dieser Familie spannungsabhängiger Kaliumkanäle beschriebene Herzrhythmusstörung, die nach ihrem Erscheinungsbild im Elektrokardiogramm durch eine verlängerte Form des QT Intervalls



**Abbildung 1.6:** Schematische Übersichtszeichnung für eine  $\alpha$ -Untereinheit der spannungsabhängigen KCNQ Kanäle vom 6TM/1P-Typ. Die KCNQ  $\alpha$ -Untereinheiten sind Typ-III Transmembranproteine. Der N- und C-Terminus liegt dabei intrazellulär. Durch die Membran hindurch spannt sich der Kanal in einer Abfolge von insgesamt sechs Transmembrandomänen S1 bis S6. Das stark positiv geladene Transmembransegment S4 bildet den Spannungssensor. An diesen grenzt der Selektivitätsfilter mit der Porenschleife zwischen den Transmembrandomänen S5 und S6. Der etwas stärker herausragende Bereich der Porenschleife in der Nähe von S5 wird als *turret domain* bezeichnet. Die TCC-Domänen sind stark aufgewundene helikale Bereiche, hervorgerufen durch spezielle Aminosäuresequenzen im C-Terminus der Kanaluntereinheiten (Lupas, 1996; Jenke et al., 2003). Der für die Assemblierung der  $\alpha$ -Untereinheiten wichtige Bereich von TCC1 bis TCC2 wird auch als *subunit interaction domain* (si-Domäne) bezeichnet. Die KCNE  $\beta$ -Untereinheiten durchspannen die Membran mit lediglich einer Transmembrandomäne. Die N-Termini der  $\beta$ -Untereinheiten sind extrazellulär, die C-Termini hingegen intrazellulär (Angelo et al., 2002).

gekennzeichnet ist und im englischen daher als „Long-QT Syndrome“ bezeichnet wird. Daneben sind fünf weitere  $\beta$ -Untereinheiten KCNE1 bis KCNE5 bekannt. Die KCNQs besitzen ausnahmslos eine 6TM/1P Struktur, wie in Abbildung 1.6 veranschaulicht. Sie sind allesamt langsam aktivierbare spannungsabhängige Kaliumkanäle. Wie für Ionenkanäle üblich, befindet sich der Spannungssensor im vierten Transmembransegment S4. Zwischen

Bezeichnung	<b>KCNQ1 (Kv7.1)</b>	<b>KCNQ2 (Kv7.2)</b>	<b>KCNQ3 (Kv7.3)</b>	<b>KCNQ4 (Kv7.4)</b>	<b>KCNQ5 (Kv7.5)</b>
<b>Erstautoren</b>	Wang et al. (1996), Yang et al. (1997)	Biervert et al. (1998), Singh et al. (1998)	Charlier et al. (1998), Yang et al. (1998)	Kubisch et al. (1999)	Lerche et al. (2000), Schroeder et al. (2000a)
<b>Andere Bezeichnung</b>	KvLQT1	KvEBN1	KvEBN2	-	-
<b>Loci der Chromosomen</b>	11p15.5	20q13.3	8q24	1p34	6q14
<b>Anzahl der Aminosäuren</b>	676	844	873	695	897
<b>Größe in kDa</b>	65/67	88	97	70	99
<b>N-Glykosylierung</b>	N160	-	-	-	-
<b>mRNA Lokalisation</b>	Herz, Niere, Lunge, Plazenta, Darmkryptenzellen, Marginalzellen der stria vascularis	NG108-15, Zentralen Nervensystem, Hoden	NG108-15, Zentralen Nervensystem, Cochlea, Knochenmark, Darm, Auge	Cochlea, äußere Haarzellen des Innenohrs,	NG108-15, Zentralen Nervensystem, quergestreifte Skelettmuskulatur
<b>In Zusammenhang stehende Erkrankungen</b>	LQT1, Romano-Ward Syndrom (RWS), Jarvell- und Lange- Nielsen-Syndrom (JLNS)	Neugeborenen- epilepsie: Benign familial neonatal convulsion (BFNC)	Neugeborenen- epilepsie: Benign familial neonatal convulsion (BFNC)	autosomal dominante Form der Taubheit (DFNA2)	-

**Tabelle 2:** Übersicht über die derzeit bekannten KCNQ  $\alpha$ -Untereinheiten KCNQ1 (Kv7.1) bis KCNQ5 (Kv7.5), sowie deren Größe in kDa, deren chromosomale Lokalisation und über die in Zusammenhang stehenden Erkrankungen nach Robbins, 2001. Die Tabelle gibt des weiteren eine Zusammenfassung über die Lokalisation der mRNA für KCNQ1 (Kv7.1) bis KCNQ5 (Kv7.5) im humanen Gewebe und in den NG108-15 Zellen. NG108-15 Zellen sind Hybride bestehend aus Ratten Neuroblastoma und Maus Glioma Zellen.

S5 und S6 liegt die sogenannte „*turret domain*“, kurz TD, eine in den Extrazellulärraum herausragende Schleife in der dreidimensionalen Struktur dieser Kanäle und der Selektivitätsfilter mit der für Kaliumkanäle üblichen Konsensussequenz. Die proteinbiochemische Größenordnung der fünf  $\alpha$ -Untereinheiten liegt zwischen 65kDa bis 99kDa. Als Besonderheit erweist sich der Umstand, dass die untereinheitenspezifischen Interaktionsbereiche der verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten ausnahmslos im C-Terminus zu finden sind (Schmitt et al., 2000; Schwake et al., 2003). KCNQ1 oder Kv7.1, früher auch als KVLQT1 bezeichnet, besteht im Fall von *Homo sapiens* aus 676 Aminosäuren und ist ungefähr 65kDa bis 67kDa

Gen	$\alpha$ -Untereinheiten					$\beta$ -Untereinheiten				
	KCNQ1	KCNQ2	KCNQ3	KCNQ4	KCNQ5	KCNE1	KCNE2	KCNE3	KCNE4	KCNE5
KCNQ1	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
KCNQ2	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
KCNQ3	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
KCNQ4	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
KCNQ5	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-

**Tabelle 3:** Übersicht über die derzeitigen bekannten Interaktionen zwischen den fünf  $\alpha$ -Untereinheiten KCNQ1 bis KCNQ5 untereinander oder zusammen mit den KCNE  $\beta$ -Untereinheiten KCNE1 bis KCNE5. Die bekannten Interaktionen sind durch ein (+) hervorgehoben.

groß. Dies war der erste klonierte spannungsabhängige Kaliumkanal vom KCNQ-Typ (Wang et al., 1996). KCNQ1 wurde bis jetzt hauptsächlich im Herzen, aber auch in der Niere, im Ohr, in der Bauchspeicheldrüse, in der Lunge, in der Plazenta und im Darm nachgewiesen (Gutman et al., 2005). KCNQ1 stellt unter den  $\alpha$ -Untereinheiten in vielfacher Weise eine Besonderheit dar, da KCNQ1 beispielsweise nur mit sich selbst zu einem Homotetramer assembliert (Barhanin et al., 1996). Zusätzlich können die  $\beta$ -Untereinheiten KCNE1 im Herzen und KCNE3 im Dünndarm mit KCNQ1 interagieren (Sanguinetti et al., 1996; Wang, W. et al., 1998; Tristani-Firouzi und Sanguinetti, 1998; Schroeder et al., 2000b). KCNQ1 und KCNE1 sind für den langsam aktivierbaren  $I_{KS}$ -Strom des Herzens verantwortlich. Im Gegensatz zu den KCNQ  $\alpha$ -Untereinheiten können die KCNE  $\beta$ -Untereinheiten jedoch keinen funktionsfähigen homotetrameren Kaliumkanal bilden.

Eine weitere Besonderheit von KCNQ1 stellt die Modifikation durch eine N-Glykosylierung im Bereich der Porenschleife an der „*turret domain*“ dar (Barhanin et al., 1996 ; Freeman et al., 2000). KCNQ1 ist damit die einzige  $\alpha$ -Untereinheit der KCNQ Kanäle mit einer N-glykosidischen Bindungsstelle, die -wie sich gezeigt hat- einen Effekt auf den resultierenden Ionenfluss und die pH-Sensitivität der  $I_{KS}$ -Ströme ausübt (Freeman et al., 2000).

Mehrere Inhibitoren, wie Linopirdin und XE991 sind für KCNQ1 bereits beschrieben. Ebenso scheint KCNQ1 sensitiv für die kanalaktivierende Substanz R-L3 (Salata et al., 1998). Mutationen in KCNQ1 führen zu autosomal dominanten Erkrankungen des Herzens, wie dem sogenannten *Romano-Ward Syndrom* (RWS), einer schweren Form von Herzrhythmusstörung, begleitet von einem Herzflimmern, dem sogenannten typischen *torsade de pointes*, das unter Umständen sogar zum Tode führt (Kannankeril und Roden, 2007).

Weiterhin konnte von Chen et al., 2003 eine Familie aus der Shandong Provinz (Volksrepublik China) identifiziert werden, bei der eine Mutation an Position S140G im

Bereich der ersten Transmembrandomäne von KCNQ1 zu einer gesteigerten Funktion (*gain-of-function*) der heteromeren Kanäle von KCNQ1-S140G mit KCNE1, sowie für KCNQ1-S140G mit KCNE2 führt und dadurch wahrscheinlich für das im Zusammenhang stehende Herzflimmern verantwortlich ist. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den zuvor für Mutationen von KCNQ1 beschriebenen Herzrhythmusstörungen, die sich entweder durch einen dominant-negativen Effekt, oder aber durch einen kompletten Funktionsverlust äußern. Auch die autosomal rezessive Form des *Jervell- und Lange-Nielson-Syndrom* (JLNS), das sich durch kongenitale Taubheit und schwerwiegende Herzrhythmusstörungen präsentiert, kann durch Veränderungen von KCNQ1 hervorgerufen werden (Keating und Sanguinetti, 2001).

KCNQ2 wird größtenteils im Gehirn, dort hauptsächlich im Hippocampus und im Kortex, gebildet und ist sogar schon im Embryonalstadium nachweisbar (Singh et al., 1998). Daneben ist KCNQ2 auch in der Lunge, im Hoden, im Herzen von Neugeborenen, im adulten Herzen, in der Brust, in den Augen, in der Plazenta und im Dünndarm zu finden (Gutman et al., 2005). Das humane KCNQ2 besitzt eine Größe von 88kDa (Surti et al., 2005). KCNQ2 interagiert mit KCNQ3 und bildet homo- und heterotetramere Kanäle (Schroeder et al., 1998) und ist hochgradig sensitiv für die Kanal blockierende Substanz Tetraethylammonium (TEA). Untersuchungen zeigten, dass KCNQ2 und KCNQ3 putative Phosphorylierungsstellen im Bereich zwischen den beiden Transmembrandomänen S4 und S5 besitzen, die einen inhibierenden Effekt auf die Funktion heteromerer KCNQ2 und KCNQ3 Kanäle zu haben scheinen (Surti et al., 2005).

KCNQ3 hat eine Größe von ungefähr 97kDa und wird ebenfalls im Gehirn, dort im Hippocampus und im Kortex, im Hoden, in der Retina, im Darm, und im Auge gebildet (Bievert et al., 1998; Surti et al., 2005). KCNQ3 interagiert mit KCNQ2 und KCNQ5 und bildet homo- oder auch heterotetramere Kanäle (Wang et al., 1998; Cooper et al., 2000). Mutationen in KCNQ3 aber auch in KCNQ2 führen zu einer Form von Neugeborenenepilepsie der „*Benign familial neonatal convulsion*“, kurz *BFNC* oder auch als *EBN1* bezeichnet. KCNQ3 kann durch eine Reihe von antiepileptischen Mitteln, wie Retigabin aktiviert werden, wodurch die KCNQ3 abhängigen Ströme zum einen in ihrer Amplitude vergrößert werden und zum anderen die Offenwahrscheinlichkeit der mit Retigabin behandelten Kanäle zunimmt (Armand et al., 1999; Schenzer et al., 2005; Tatulian et al., 2003). Die weiteren Untereinheiten KCNQ2, KCNQ4 und KCNQ5 werden ebenfalls durch Retigabin moduliert. KCNQ1 hingegen bildet hierbei eine Ausnahme und wird nicht durch Retigabin moduliert.

Das humane KCNQ4 besteht aus 695 Aminosäuren und besitzt eine Größe von ungefähr 70kDa und kommt vor allem in den Haarzellen des Innenohrs vor (Kubisch et al., 1999). Mutationen in KCNQ4 zeichnen sich durch eine fortschreitende, autosomal dominant vererbte Form der Taubheit *DFNA2* aus. Weiterhin wurde ebenfalls die Bildung von heterotetrameren Kanälen mit KCNQ3 beschrieben (Jentsch et al., 2000), die aber eher von untergeordneter physiologischer Bedeutung ist, da die beiden  $\alpha$ -Untereinheiten KCNQ3 und KCNQ4 in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen wurden. Eine gleichzeitige Expression von KCNQ4 mit der  $\beta$ -Untereinheit KCNE3 wirkt sich inhibierend auf die Amplitude der gemessenen Ströme in *Xenopus* Oozyten aus (Schroeder et al., 2000b), aber auch andere KCNE  $\beta$ -Untereinheiten, wie KCNE1, KCNE2, KCNE4 und KCNE5 können KCNQ4 modulieren (Seebohm et al., 2006).

KCNQ5 wird hauptsächlich im Gehirn und in der quergestreiften Skelettmuskulatur gebildet. Derzeit konnte noch keine Erkrankung mit KCNQ5 in Verbindung gebracht werden. Mehrere Spleißvarianten sind für den Menschen beschrieben, die eine Größe von 99kDa besitzen (Lerche et al., 2000; Schroeder et al., 2000a). Die erste beschriebene Spleißvariante ist hauptsächlich im Gehirn nachweisbar und besteht aus 897 Aminosäuren, die zweite und dritte Spleißvariante sind hauptsächlich in der quergestreiften Skelettmuskulatur zu finden und bestehen aus 888 und 907 Aminosäuren (Schroeder et al., 2000a).

KCNQ5 kann wie bereits erwähnt mit KCNQ3 heterotetramere Kanäle bilden (Wickenden et al., 2001). Daneben ist auch eine Assemblierung zum Homotetramer möglich. Zusammen mit KCNQ3 ist auch eine Aktivierung durch das Antikonvulsium Retigabin beschrieben (Wickenden et al., 2001). Linopirdin hingegen wirkt auf den heterotetrameren Kanal mit KCNQ3 inhibierend (Robbins, 2001).

## **1.7 Assemblierung von spannungsabhängigen KCNQ Kaliumkanälen**

Die spannungsabhängigen KCNQ Kaliumkanäle bestehen aus mehreren Untereinheiten, die miteinander in Wechselwirkung treten, um gemeinsam einen funktionsfähigen Kanal zu bilden. In der Regel geschieht diese Interaktion für die meisten derzeit untersuchten Kaliumkanäle über N-terminal gelegene Domänen, wie es beispielsweise anhand der T1 Region bei *Shaker*-Kanälen beschrieben wurde (Pfaffinger und DeRubeis, 1995). Eine Ausnahme bilden die ebenfalls spannungsabhängigen Kanäle der *EAG* (*ether a go-go*)-Familie, wie Eag1 und Erg1, sowie die Familie der KCNQs (Ludwig et al., 1997; Jenke et al., 2003).

Für die T1-Domäne ist eine Vielzahl an unterschiedlichen Funktionen bekannt. Kobertz et al. postulierten 2000, dass die T1-Domäne über eine längere Aminosäureabfolge mit den sechs Transmembrandomänen und dem carboxyterminalen Ende des Shaker-Kanals verbunden ist, ähnlich einer am Seil „hängenden Gondel“. Die Assemblierung zu einem funktionierenden Shaker-Kanal erfolgt demnach durch das Zusammenwirken von insgesamt vier solcher T1 „Gondeln“. Eine Deletion dieses T1 Bereiches führt zu einer erheblichen, aber nicht gänzlichen Abnahme der Bildung von tetrameren Kanälen (Lee et al., 1994; Kobertz und Miller, 1999).

Die T1 Domäne ist gekennzeichnet durch die Ausbildung eines dreidimensional gefalteten Motivs, der sogenannten BTB/POZ (*broad complex Tram-track bric-a-brac/Pox virus and zinc finger*) Domäne, bei der es sich um eine hoch konservierte Protein-Protein Interaktionsdomäne handelt (Bardwell and Treisman 1994; Zollman et al., 1994). Die BTB/POZ-Domäne besteht im Fall der T1 Domäne spannungsabhängiger Shaker-Kanäle aus durchschnittlich 95 Aminosäuren, die in einer Abfolge von fünf hintereinanderliegenden  $\alpha$ -Helices insgesamt zwei übergeordnete Haarnadelstrukturen (A1/A2 und A4/A5) ausbilden, und über eine weitere  $\alpha$ -Helix A3 miteinander verbunden sind (Stogios et al., 2005).



**Abbildung 1.7: BTB/POZ Motiv für die T1-Domäne von Kv1.1 Kanälen aus der Shaker-Familie nach Stogios et al., 2005.** (A) BTB/POZ Monomer für die T1 Domäne von Shaker-Kanälen bestehend aus fünf  $\alpha$ -Helices, sowie drei  $\beta$ -Faltblättern mit einer B1/B2/A1/A2/B3/A3/A4/A5 Abfolge. (B) Tetramerisierungs-Interface für die T1-Domäne. (C) Kv1.1 T1 Homotetramer.

Daneben sind zusätzlich drei  $\beta$ -Faltblätter (B1/B2/B3) an der Ausformung des BTB/POZ Motivs beteiligt, wie in Abbildung 1.7 verdeutlicht wird. Die T1-Domäne dient aber nicht nur der Bildung von homotetrameren Shaker-Kanälen. Auch die heteromere Assemblierung von Kv1 Kanälen mit den  $\beta$ -Untereinheiten Kv $\beta$ 1.1, Kv $\beta$ 1.2, Kv $\beta$ 2 und Kv $\beta$ 3 in einer  $\alpha_4/\beta_4$  Stöchiometrie geschieht über die T1-Domäne (Gulbis et al., 2000).

Neuere Untersuchungen ergaben eine weitere Funktion für die T1-Domäne. Demnach dient ihr Vorhandensein dem gezielten Transport von Shaker-Kanälen an die Membran von



Axonen, möglicherweise unter Mitwirkung der an die T1-Domäne bindenden Kv $\beta$ -Untereinheiten (Gu et al., 2003).

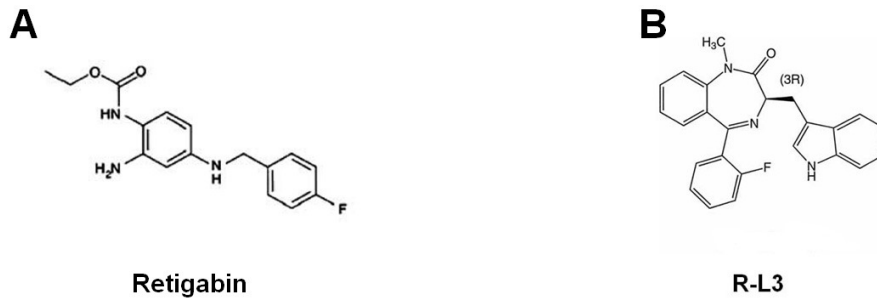
Im Gegensatz zu den spannungsabhängigen Shaker-Kanälen erfolgt die Assemblierung von spannungsabhängigen KCNQ Kanälen nicht über eine aminoterminal gelegene T1-Domäne. Homotetramere Kanäle bestehend aus KCNQ2, KCNQ3 und KCNQ5 aber auch heterotetramere Kanäle bestehend aus KCNQ3 und KCNQ2 oder KCNQ3 und KCNQ5 sind verantwortlich für den sogenannten M-Strom  $I_{K(M)}$  (Wang et al., 1998; Schroeder et al., 2000a). Für sich allein bilden die beiden KCNQ Untereinheiten KCNQ2 und KCNQ3 homotetramere Kanäle, die nur Ströme von geringer Amplitude erzeugen. Der heterotetramere Kanal hat eine verstärkte Oberflächenexpression und erzeugt Ströme mit einer zehnfach erhöhten Amplitude im Vergleich zu den beiden homotetrameren Kanälen allein (Schwake et al., 2000; Maljevic et al., 2003). Das im Herzen vorkommende KCNQ1 bildet hingegen ausschließlich homotetramere Kanäle. Als Beweis für die überaus wichtige Rolle des C-Terminus bei dem Zusammenspiel von mehreren  $\alpha$ -Untereinheiten, wurden chimäre KCNQ  $\alpha$ -Untereinheiten auf molekularbiologischem Weg erzeugt, bei denen der vordere Bereich vom N-Terminus bis zur sechsten Transmembrandomäne der  $\alpha$ -Untereinheit von KCNQ1 zuzuordnen ist, der hintere C-terminale Bereich hingegen entspricht der  $\alpha$ -Untereinheit von KCNQ3. Diese Chimären sind nun in der Lage mit KCNQ2 zusammen den um Faktor zehn höheren, charakteristischen M-Strom zu erzeugen, der sich wiederum deutlich sowohl von den KCNQ1 typischen als auch von dem alleinigen Strom der homotetrameren  $\alpha$ -Untereinheiten KCNQ2 und KCNQ3 unterscheidet (Maljevic et al., 2003). Mit Hilfe weiterer Chimären zwischen KCNQ1 und KCNQ3 konnte der für die Interaktion wichtige Bereich bis auf die Untereinheiten spezifische Wechselwirkungsdomäne (si-Domäne) eingegrenzt werden (Schwake et al., 2003). Diese Domäne wird durch das Auftreten zweier verstärkt helikal gewundener *coiled coil* Domänen charakterisiert, die vermutlich eine wesentliche Rolle bei der Interaktion der beiden ebenfalls spannungsabhängigen Kanäle Eag1 und Erg1, sowie der KCNQ  $\alpha$ -Untereinheiten spielen (Jenke et al., 2003).

Über die Stöchiometrie heterotetramerer Kanäle, bestehend aus den Untereinheiten von KCNQ3 mit KCNQ2, KCNQ4 oder KCNQ5, gibt es derzeit nur ungenügende Aussagen. Pharmakologische Untersuchungen zur Stöchiometrie heterotetramerer Kanäle bestehend aus KCNQ2 und KCNQ3 ergaben ein Verhältnis von 1:1 für die beiden  $\alpha$ -Untereinheiten in den Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO Zellen) und für M-Strom native Neuronen (Hadley et al., 2003).

## 1.8 Pharmakologische Einflüsse auf die Familie der spannungsabhängigen KCNQ Kanäle

Es sind viele pharmakologische Substanzen bekannt, die einen Einfluss auf eine Fülle von unterschiedlichen Kaliumkanälen ausüben. Dabei ist die Wirkungsweise und die benötigte Dosis von Kanal zu Kanal verschieden. Für den einen Kanal kann die untersuchte Substanz aktivierend wirken, für den nächsten wiederum inhibierend. Oftmals ist die Konzentration der eingesetzten Substanz von ebenso entscheidender Bedeutung.

Eine der mit am besten untersuchten pharmakologischen Substanzen stellt beispielweise die Ionenform des Tetraethylammonium (TEA) dar. TEA ist ein für Kaliumkanäle wirksamer Inhibitor. Aufgrund seiner geringen Größe kann dieses Ion weit in die Öffnung der Porenregion hinein gelangen und dort einen Effekt auf den Kanal ausüben, wie anhand des 6TM/1P *Shaker*-Kanals gezeigt werden konnte (MacKinnon und Yellen, 1990; Heginbotham und MacKinnon, 1992b). TEA bindet dabei entweder an die nach außerhalb gelegenen aromatischen Aminosäuren 431 und 449 des Selektivitätsfilters, oder wie auch gezeigt wurde, durch intrazelluläres TEA an die nur von innerhalb zu erreichende Aminosäure 441 in der Porenregion der *Shaker*-Kanäle (Yellen et al., 1991). Jeweils eine dieser drei Aminosäuren pro Untereinheit vereinigt sich dabei mit einem TEA Molekül. Durch eine gleichzeitige Verknüpfung desselben TEA Moleküls an die übrigen drei  $\alpha$ -Untereinheiten des tetrameren *Shaker*-Kanals kann dann die Pore verstopft werden. Die Empfindlichkeit der unterschiedlich spannungsabhängigen Kaliumkanäle auf TEA ist unterschiedlich. Beispielsweise erweist sich KCNQ2 um einiges sensitiver auf die Wirkung von TEA als KCNQ3 (Hadley et al., 2000). Mit Hilfe der unterschiedlichen Sensitivität gelang es auch Aussagen über die Stöchiometrie von heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Kanälen zu treffen. Zu diesem Zweck wurden die durch TEA erniedrigten Ströme sowohl homotetramerer KCNQ2 und KCNQ3 Kanäle, als auch die von nativen, M-Strom beinhaltenden Neuronen gemessen und verglichen. Konkatemere Proteine, bestehend aus den zwei molekularbiologisch verknüpften  $\alpha$ -Untereinheiten KCNQ2 und KCNQ3, zeigten dabei ein ähnliches Verhalten in Bezug auf TEA wie native Neuronen, weshalb eine 1:1 Stöchiometrie für diese M-Strom auslösenden Kanäle vermutet wird (Hadley et al., 2003). TEA ist aber nicht die einzige pharmakologische Substanz, die einen signifikanten Einfluss speziell auf Kaliumkanäle von der Art der KCNQs ausübt. Vielmehr wirken eine Reihe von Anfall inhibierenden Pharmazeutika, sogenannte Antikonvulsiva, gerade auf die KCNQs und bieten dadurch ein breites Spektrum für die Behandlung von epileptischen Erkrankungen (Jentsch, 2000). Antikonvulsiva sind Substanzen, die epileptischen Anfällen entgegenwirken. Eines der best untersuchten Antikonvulsiva ist



**Abbildung 1.8: Die auf KCNQ Kanäle wirkenden pharmakologische Substanzen Retigabin und R-L3.** Projektionsformeln für unterschiedliche, auf die KCNQ  $\alpha$ -Untereinheiten wirkende pharmakologische Substanzen. (A) Darstellung des Antikonvulsivum Retigabin (Schenzer et al., 2005) und (B) des zu den Benzodiazepin gehörenden R-L3 (Salata et al., 1998).

Retigabin. Retigabin wirkt auf die KCNQ Untereinheiten KCNQ2 bis KCNQ5 in unterschiedlich starker Weise, wobei KCNQ3 am stärksten moduliert wird. KCNQ1 scheint hingegen nicht von Retigabin beeinflusst zu werden (Tatulian et al., 2001; Wickenden et al., 2001; Schenzer et al., 2005).

Der Umstand, dass Retigabin einen Einfluss auf die M-Strom vermittelnden Eigenschaften der heteromer interagierenden Kanäle KCNQ2 und KCNQ3 ausübt, erweist sich als besonders günstig bei der Behandlung von epileptischen Erkrankungen. Eine Reihe von Antikonvulsiva wirken direkt auf die Azetylcholinrezeptoren, wodurch die Erregbarkeit von Neuronen herabgesetzt und die Rate des Feuerns elektrischer Impulse reduziert wird. Retigabin wirkt aber vor allem auf den M-Strom aktivierend, womit die Muskarin abhängigen Azetylcholinrezeptoren indirekt über die Wirkung auf KCNQ2 und KCNQ3 reguliert werden. In CHO Zellen öffnen die mit Retigabin behandelten heteromeren Kanäle wesentlich früher und bei einem weitaus negativeren Potential, im Vergleich zu den heteromeren Kanälen unbehandelter Zellen. Daneben nimmt die Amplitude der gemessenen Ströme für die mit Retigabin behandelten Kanäle insgesamt, bedingt durch eine ebenfalls erhöhte Offenwahrscheinlichkeit, deutlich zu (Tatulian and Brown, 2003). Der für die Interaktion von Retigabin mit den Untereinheiten KCNQ2 bis KCNQ5 notwendige Bereich konnte auf die eine, für alle sensitiven KCNQ Untereinheiten im fünften Transmembransegment konservativ vorliegende Aminosäure Tryptophan eingegrenzt werden (Schenzer et al., 2005).

Eine weitere Kanal aktivierende Substanz ist R-L3, dessen Wirkung auf KCNQ1 erstmals 1998 von Salata et al. beschrieben wurde. Die Abbildung 1.8 zeigt die Projektionsformel für R-L3. R-L3 gehört zu den Benzodiazepinen, einer großen Gruppe von Pharmazeutika, zu denen Beruhigungsmittel wie Valium und andere Sedativa gezählt werden. Benzodiazepine bestehen aus einem sechsgliedrigen Benzolring, an den ein siebengliedriger und zwei Stickstoffatome enthaltender Diazepinring geknüpft ist. Zusätzlich können wie im Fall von R-L3 weitere Modifikationen enthalten sein. R-L3 ist der einzige bisher beschriebene Aktivator

des sogenannten  $I_{KS}$ -Strom des Herzens (Salata et al., 1998). Die Wirkung von R-L3 auf KCNQ1 basierenden Kanälen ist mannigfaltig und reversibel. Der stärkste Effekt kann bei einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  beobachtet werden. Höhere Konzentrationen von beispielsweise  $10\mu\text{M}$  haben einen eher inhibierenden Effekt auf die Amplitude der gemessenen Ströme (Salata et al., 1998). Bei einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  verkürzt R-L3 die Länge des Aktionspotentials und verhindert eine zu frühe Nachpolarisation in Kaninchen Myozyten, die zuvor mit Dofetilide behandelt wurden (Xu et al., 2002). Dofetilide ist eine Substanz, die den schnell aktivierbaren  $I_{KR}$ -Strom, der durch die Kombination aus dem spannungsabhängigen Kaliumkanal KCNH2 oder auch HERG genannt, zusammen mit der  $\beta$ -Untereinheit KCNE2 erzeugt wird, blockiert und dadurch ein Nachahmen der Herzrhythmusstörung *LQT2* ermöglicht.

R-L3 sorgt zum anderen auch dafür, dass die Amplitude der resultierenden Ströme für KCNQ1 um ein Vielfaches zunimmt im Vergleich zu den gemessenen Strömen ohne R-L3 (Salata et al., 1998). Gleichzeitig erfolgt die Erregbarkeit für KCNQ1 Kanäle früher und bei einem viel stärker negativen Potential im Vergleich zu den unbehandelten Kanälen. Die Kanäle beginnen somit deutlich früher mit der Öffnung der Pore. Außerdem verringert R-L3 die Anzahl der Aktivierungen und Deaktivierungen des Kanals.

Bemerkenswert ist dennoch, dass obwohl R-L3 ein Aktivator für den  $I_{KS}$ -Strom ist, die beobachteten Effekte für einen homotetrameren Kanal ohne zusätzliche  $\beta$ -Untereinheit deutlich ausgeprägter sind. So konnte gezeigt werden, dass der für die Interaktion von R-L3 mit der  $\alpha$ -Untereinheit von KCNQ1 wichtige Bereich im Selektivitätsfilter zwischen den beiden Transmembrandomänen S5 und S6 zu sein scheint, dem Ort, an dem auch die  $\beta$ -Untereinheit von KCNE1 mit der  $\alpha$ -Untereinheit KCNQ1 in Wechselwirkung tritt (Seebohm et al., 2003). Über die Wirkung von R-L3 auf die weiteren  $\alpha$ -Untereinheiten KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 und KCNQ5, oder aber auch KCNQ1 mit den übrigen  $\beta$ -Untereinheiten KCNE2, KCNE3, KCNE4 und KCNE5 zusammen ist derzeit noch nichts bekannt.

## 1.9 Fragestellung

Vier von fünf KCNQ  $\alpha$ -Untereinheiten können mit zum Teil gravierenden Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden. Eine Veränderung von KCNQ1 führt zu schwerwiegenden Herzrhythmusstörungen, dem *L-QT* Syndrom mit teilweise tödlichem Ausgang. Mutationen von KCNQ2 und KCNQ3 treten in Form von epileptischen Anfällen bei Neugeborenen in Erscheinung. Nicht funktionelle KCNQ4 Kanäle sind für eine kongenitale Form der Taubheit

verantwortlich. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher Aussagen zur Assemblierung dieser spannungsabhängigen Kaliumkanäle getroffen werden, um einen genaueren Überblick über das Zusammenwirken von KCNQ Kanälen und die im Zusammenhang mit krankhaften Veränderungen stehenden Mutationen zu erhalten.

Für die si-Domäne spannungsabhängiger KCNQ Kanäle wurde das Vorhandensein von zwei *coiled coil* Domänen vermutet (Jenke et al., 2003). Untersuchungen zur Funktion dieser stark  $\alpha$ -helikal spiralisierten Domänen ergaben für eine Reihe von Proteinen die Möglichkeit zur Multimerisierung, so dass eine vergleichbare Funktion für die KCNQ Kanäle angenommen wurde. Es sollte daher im Rahmen dieser Arbeit die Eingrenzung der für die Assemblierung von KCNQ Kanälen essentiellen Bereiche auch unter Berücksichtigung der für die KCNQ Kanäle vermuteten *coiled coil* Strukturen erfolgen.

Ein Großteil der Untersuchungen zur Assemblierung spannungsabhängiger KCNQ Kanäle geschah durch elektrophysiologische Experimente anhand von cRNA injizierter *Xenopus* Oozyten. Dabei handelt es sich häufig um *in vitro* Nachweise, die nicht immer vergleichbar mit der in Geweben vorherrschenden *in vivo* Situation sind. Daher werden oft zur Verifizierung von Experimenten zusätzliche Methoden angewandt, um den tatsächlichen Gegebenheiten *in vivo* besser zu entsprechen und mehrere wissenschaftlich exakte Aussagen zu erhalten. Für zusätzliche proteinbiochemische Untersuchungen zur Assemblierung von KCNQ Kanälen aus endogenen Geweben wurden beispielsweise gut funktionierende Antikörper benötigt, die aber nicht vorhanden waren. Deshalb war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Produktion und Charakterisierung von polyklonalen Antikörpern gegen die zwei im Gehirn vorkommenden KCNQ Kanäle KCNQ2 und KCNQ3, zur möglichen Aufklärung der Stöchiometrie heteromerer KCNQ Kanäle aus endogenem Gewebe.

Das Benzodiazepin R-L3 wirkt aktivierend auf die homotetrameren Kaliumkanäle KCNQ1 des Herzens und führt dadurch zu verkürzten Aktionspotentialen (Salata et al., 1998). Die Wirkung von R-L3 auf die weiteren  $\alpha$ -Untereinheiten, speziell der im Gehirn vorkommenden Untereinheiten KCNQ2, KCNQ3 und KCNQ5 oder der in den Haarzellen des Innenohrs vorkommenden Untereinheit KCNQ4, ist noch unbekannt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand deshalb darin, die Wirkung von R-L3 auf die im Gehirn und im Innenohr vorkommenden Untereinheiten KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 und KCNQ5 zu untersuchen, um dadurch möglicherweise neue Anhaltspunkte bei der Behandlung der im Zusammenhang mit den für KCNQ Kanäle beschriebenen Erkrankungen zu erhalten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

96-Loch -Mikrotiterplattenleser Sunrise	Tecan, Crailsheim, D
Agarosegelkammer Modell H5	Roth, Karlsruhe, D
Analysewaage	Kern & Sohn, Dürrwangen, D
Autoklav Tecnomara	Integra, Fernwald, D
Binokular	Zeiss, Jena, D
Brutschrank	Hettich, Tuttlingen, D
Brutschrank	Heraeus, Hanau, D
Chemilumineszenzkamera LAS-1000/3000	Fujifilm, Carrollton, USA
CO <sub>2</sub> -Inkubatoren	Heraeus, Hanau, D
Digitizer Digidata 1322A	Axon instruments, USA
DNA-Photometer GeneQuant pro,	Biochrom, Cambridge, UK
Elektrischer Bunsenbrenner HORO,	Ostfildern, D
Elektroporationsküvetten	PeqLab, Erlangen, D
Genepulser	BioRad, München, D
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg, D
Horizontal-Pipettenziehgerät	Zeitz-Instrumente, Augsburg, D
Horizontalschüttler RM 5 Assistent,	Sondheim, D
Luminometer des Typs TD-20/20	TURNER, Sunnyvale, USA
Mirkopipetten-Injektionsgerät Nanoliter 2000	WPI, Sarasota, USA
Mikrowellen	Panasonic, Japan
Multipette Eppendorf,	Hamburg, D
Nass-Blot-Apparatur	BioRad, München, D
PCR-Cycler	Perkin Elmer, USA
pH-Meter Krick,	Langenselbold, D
Phosphoimager – BAS-1000/LAS-1000	Fuji Film, Kanagawa, Japan
Photometer GENE QUANT PRO	GENE QUANT, Cambridge, GB
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Rundumschüttler Assistent,	Sondheim, D

SDS-Geltrockner GelAir Dryer	BioRad, München, D
SDS-PAGE, Mini-Protean 3-Elektrophoresis	BioRad, München, D
Semi-Dry-Blot-System, Transblot SD	BioRad, München, D
Spannungsquellen PowerPack 200/300	BioRad, München, D
Sterilbank danLAF VFR 1806	Claus Damm A/S, Humlebaek, DK
Stereomikroskop	Zeiss, Jena, D
Thermoblock	Eppendorf, München, D
Ultraschall Stab, micro ultrasonic disrupter	KONTES, USA
UV-Tisch Intas UV-Systeme,	Intas, Göttingen, D
Video-Drucker	Intas, Göttingen, D
Video-Kamera	Intas, Göttingen, D
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, CH
Waage	Sartorius, Göttingen, D
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, D
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Verstärker TurboTec-05x npi	npi electronic GmbH, Tamm, D
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg D
Zellzentrifuge Universal 32, Typ1605	Hettich, Tuttlingen, D
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, D
J2-HS Zentrifuge	Beckman, München, D

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

96-Loch-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Cellophanfolien	BioRad, München, D
Einfrierröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Einmalspritzen	Becton Dickinson, Madrid, E
Handschuhe	Roth, Karlsruhe, D
Parafilm M	American National Can, Greenwich, GB
pH-Indikatorstreifen	Macherei-Nagel Düren, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Plastik-Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
PVDF-Membran	Roth, Karlsruhe, D

## MATERIAL

---

Reaktionsgefäße, 1,5ml oder 2ml	Eppendorf, Hamburg, D
Skalpell Feather, Nr.10	pfm, Köln, D
Sterilfilter Filtropurs 0.2	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterile Schraubdeckelröhrchen, 15ml oder 50ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Whatman Papier	Maidstone, GB
Zellkulturschalen 3cm, 6cm und 10cm	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellschaber	TPP-Techno Plastic Products, Schweiz

### 2.1.3 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben stammt der überwiegende Teil der verwendeten Chemikalien von den Unternehmen Ambion (Austin, USA), BIORAD (München, Deutschland), FLUKA (Neu-Ulm), MERCK (Darmstadt), ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim), ROTH (Karlsruhe), SERVA (Heidelberg), SIGMA-ALDRICH (Deisenhofen) und WALTER-CMP (Kiel), die ausschließlich in den Qualitätsstufen *reinst* oder *p.A* verwendet wurden. Die verwendeten radioaktiven Nukleotide stammten von der Firma MP BIOMEDICALS (Eschwege, Deutschland).

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

**10x SDS-Elektroden-Laufpuffer:** 144g/l Glycin, 30g/l Tris, 1% SDS (w/v).

**10x TBS:** 30g/l Tris-HCl, 90g/l NaCl, 2g/l KCl, pH 7,4.

**20x TAE:** 0,8M Tris, 0,2M NaAcetat, 20mM NaEDTA, pH 7,8.

**4x Auftragspuffer für SDS-Gele:** 8% SDS (w/v), 400mM DTT, 40% Glycerin, 200mM Bromphenolblau 0,2% (w/v), Tris-HCl pH 6.8

**Kinasepuffer (Phosphorylierung):** 8mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM EGTA, 50mM Tris, 50mM PIPES pH 6.8 mit Proteaseinhibitorcocktail I+II (Sigma).



---

## MATERIAL

---

<b>Lysispuffer (KoIP):</b>	120mM NaCl, 1mM EGTA, 5mM DTT, 50mM Tris-HCl, 10% (v/v) Glycerin, 1x Complete.
<b>ND96-Lösung:</b>	96mM NaCl, 2mM KCl, 1,8mM CaCl <sub>2</sub> , 1mM MgCl <sub>2</sub> , 5mM HEPES, pH 7,4.
<b>PBS:</b>	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 7,4mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4.
<b>Phosphatpuffer (PNGase):</b>	50mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .
<b>Stripp Puffer:</b>	62,5mM Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 100mM β-Mercaptoethanol, pH 6,8.
<b>Sammelgel-Puffer:</b>	60,55g/l, 0,4% (w/v) SDS, pH 6,8.
<b>SDS-Transferpuffer:</b>	25mM Tris-HCl, 0,02% (w/v) SDS, 0,5mM DTT, pH 8,4.
<b>Semidry Transferpuffer:</b>	10% (v/v) Methanol, 3,0g/l Tris-HCl, 12,12g/l Glycin, pH 8,3.
<b>Tank Blot Transferpuffer:</b>	20% (v/v) Methanol, 3,03g/l, 14,4g/l Glycin, pH 8,3.
<b>Trenngel-Puffer:</b>	181,7 g/l Tris, 0,4% SDS (w/v), pH 8,8.
<b>Western-Blot Blockierlösung:</b>	5% Magermilchpulver, 0,1% (v/v) Tween-20, 1xTBS.
<b>Western-Blot Waschlösung:</b>	0,1% (v/v) Tween-20, 1xTBS.

### 2.1.5 Oligonukleotide

Die Gesamtheit der verwendeten Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktion stammten von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland). Die Oligonukleotide wurden

---

## MATERIAL

---

lyophilisiert geliefert und zunächst in einer Konzentration von 100µM in H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> angesetzt und bei -20°C gelagert. Für die Polymerasekettenreaktion wurden die verwendeten Oligonukleotide auf eine Konzentration von 10µM weiter verdünnt.

<b>Name:</b>	<b>Sequenz:</b>
<b>3PFR</b>	GAG ACT CCA TTC GGG TGT TCT
<b>NK_49_Q2</b>	CTG GGA GAT GCT GAA GCC G
<b>PTLN_seq1h</b>	GAA TAA ACG CTC AAC TTT GGC AGA TC
<b>Q1_AES_hin</b>	GAC GCG GTG GGC GAG TCA GGC
<b>Q1_AES_revers</b>	GCC TGA CTC GCC CAC CGC GTC
<b>Q1_HA_tag_down</b>	CCG GAA TTC TCA AGC GTA GTC TGG GAC GTC GTA TGG GTA GGA CCC CTC ATC GG
<b>Q1_HA_tag_up</b>	CTC CGG AAG GCC CCC CGG AGC CAC ACT C
<b>Q1_sid1_r</b>	CCC CAT CAT GCT TTG GTC CCC TTT CTG AGA CTT CTT
<b>Q1_sid2_r</b>	CCC CAT CAT GCT TTG GTC TTT TGG CGT GGA GGG A
<b>Q1_sid3_r</b>	CCC CAT CAT GCT TTG GTC AGG GGT GAA AAT CAT AT
<b>Q1_TD_Q3_hin</b>	GTA CTT TGT GTA CCT GGC TGA GAA AGA CGT CCC AGA G
<b>Q1_TD_Q3_revers</b>	CCA CAG CGC ATC TGC GTA GGT CTC AAA CTC CTC TTT C
<b>Q1TDQ3 FU1</b>	CTG GGA CGT CTT TCT CAG CCA GGT ACA CAA AGT AC
<b>Q1TDQ3 FU2 hin</b>	GAA AGA GGA GTT TGA GAC CTA CGC AGA TGC GCT GTG
<b>Q2 NK 42 hin</b>	GAT GAT CCG CAT GGA CCG GC
<b>Q2 NK 42 zurück</b>	GCC GGT CCA TGC GGA TCA TC
<b>Q2(TDQ1)FU1_hin</b>	CCT GGT GTA CTT GGC AGA GAA GGA CGC GGT GAA C
<b>Q2(TDQ1)FU1_rück</b>	GTT CAC CGC GTC CTT CTC TGC CAA GTA CAC CAG G
<b>Q2(TDQ1)FU2_hin</b>	GGT GCC CCA GAC GTG GAC GGC AGG CTC CTT G
<b>Q2(TDQ1)FU2_rück</b>	CAA GGA GCC TGC CGT TCC ACG TCT GGG GCA CCT TG
<b>Q2_del_TCC1_r</b>	ATG AAT TCT CAG TCG TAG GGC CGC AGG CTC
<b>Q2_L585P_h</b>	CTG TCC CGA ATT AAG AGC CCG CAG TCC
<b>Q2_L585P_r</b>	GGA CTG CGG GCT CTT AAT TCG GGA CAG
<b>Q2_L637P_h</b>	GAG AAG AAG CCG GAC TTC CTG
<b>Q2_L637P_r</b>	CAG GAA GTC CGG CTT CTT CTC
<b>Q2_TCC2_CTBHL_r</b>	ATG GAT CCC CTT CCT GGG CCC GGC CCA G
<b>Q2_TCC2_NT-h</b>	CGC GGA TCC GAG GCG GAG CTG CCC GAG
<b>Q2_TCC2_NT-r</b>	CGC GGA TCC CTG CCA GGA GGT GGA GGG
<b>Q3_dsid_d615_h</b>	GAC CAA AGC ATG ATG GGG AAG TTT G

## MATERIAL

---

**Q3\_I566F\_h** CTT CAG ACG AGA ATA GAT ATG TTT TTC ACC CCT GGA CCT  
 C  
**Q3\_I566F\_r** GAG GTC CAG GGG TGA AAA ACA TAT CTA TTC TCG TCT GAA  
 G  
**Q3\_K591H\_h** GAC CAA AGC ATG ATG GGG CAC TTT GTA AAA GTT GAA AG  
**Q3\_K591H\_r** CTT TCA ACT TTT ACA AAG TGC CCC ATC ATG CTT TGG TC  
**Q3\_K594Q\_h** GCA TGA TGG GGC ACT TTG TAA AAG  
**Q3\_K594Q\_r** CTT TTA CAA AGT GCC CCA TCA TGC  
**Q3\_L533W\_h** GGA GAC TTG GAG GCC TTA CGA TGT GAA GGA TGT GAT TGA  
 G  
**Q3\_L533W\_r** CTC AAT CAC ATC CTT CAC ATC GTA AGG CCT CCA AGT CTC  
 C  
**Q3\_M589D\_h** GAA ATC GAA GAC CAA AGC ATG GAC GGG AAG TTT GTA AAA  
 G  
**Q3\_M589D\_r** CTT TTA CAA ACT TCC CGT CCA TGC TTT GGT CTT CGA TTT  
 C  
**Q3\_sidQ3\_r** CAA CCG TTC CAT GTG TTG C  
**Q3NT\_CB\_r** CCA GGA CAA TCA GGA ACA CC  
**Q4(TDQ1)FU1h** CTT CCT GGT CTA CCT GGC CGA GAA GGA CGC GGT G  
**Q4(TDQ1)FU1rück** CAC CGC GTC CTT CTC GGC CAG GTA GAC CAG G  
**Q4(TDQ1)FU2h** GGT TGC CCC AGA CGT GGC TGG GCA GGG TCC TG  
**Q4(TDQ1)FU2r** GGA CCC TGC CCA GCC ACG TCT GGG GCA CCT TG  
**Q4\_BEIMI\_1h** GCA CCA GGA ACT TGC CAA CG  
**Q4\_BEIMI\_1rev** GGA GCG GAT GAC TGT CTT CAC  
**Q4TDQ1CTQ3hin** CTT CGA GAA GCG GAG GAA GCC AGC TGC TGA G  
**Q4TDQ1CTQ3rück** CTC AGC AGC TGG CTT CCT CCG CTT CTC GAA G  
**Q5(TDQ1)FU1h** CTT TCC TTG TCT ATC TGG TGG AGA AGG ACG CGG TG  
**Q5(TDQ1)FU1r** CAC CGC GTC CTT CTC CAC CAG ATA GAC AAG GAA AG  
**Q5(TDQ1)FU2h** CAA GGT GCC CCA GAC GTG GCT GGG AAG ATT G  
**Q5(TDQ1)FU2rück** CAA TCT TCC CAG CCA CGT CTG GGG CAC CTT G  
**Q5\_1\_r** GGC GTC AGA ATG AAC TGC AGG  
**Q5\_CT\_HA\_EcoRI** AAG AAT TCT TAA GCG TAG TCT GGG ACG TCG TAT GGG TAT  
 TTC AGT TTG ACA TGA GGC AAG C  
**Q5\_CT\_r** GGT GGT TGC TCT TCC GCA TTT CAG TTT GAC ATG AGG  
**Q5\_GGA\_forward** CTT CGG AAA GGC GAG CCC TCA GCC CTC  
**Q5\_GGA\_revers** GAG GGC TGA GGC CTC GCC TTT CCG AAG  
**Q5\_PKAex1\_h** CTT CGG AAA GGC GCT GCC TCA GCC CTC

**Q5\_PKAex1\_r**      GAG GGC TGA GGC AGC GCC TTT CCG AAG  
**Q5\_seq5\_h**        CAA CGA CCG AAC CCG CTT CC

### 2.1.6 Bakterienstämme

**XL-1Blue:**        *endA1 hsdR12(rK<sup>-</sup> mK<sup>+</sup>) supE44 gyrA46 thi-1  
relA1, lac<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, proAB, lac1<sup>q</sup>, lacZΔM15, tet<sup>r</sup>, recA1*  
Resistent gegenüber dem Antibiotikum Tetracyclin.  
(Bullock et al, 1987)

**BL21(DE3)pLysS:** F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)pLysS (Cam<sup>R</sup>).  
Resistent gegenüber dem Antibiotikum Chloramphenicol (34 µg/ml).  
Sehr stringenter Expressionsstamm (Novagen, USA).  
Proteinexpression wird durch Zugabe von 1mM IPTG induziert.

**BLR(DE3):**        F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) Δ(srl-recA)306::Tn10  
(Tet<sup>R</sup>).Resistent gegenüber dem Antibiotikum Tetracyclin (12,5 µg/ml).  
recA<sup>-</sup> sehr stringenter Expressionsstamm (Novagen, USA):  
Proteinexpression wird durch Zugabe von 1mM IPTG induziert.

### 2.1.7 Bakteriennährmedium

**Luria-Bertani-Medium (LB<sub>0</sub>):**

Bacto Trypton	10,0g
Bacto Hefeextrakt	5,0g
NaCl	10,0g
ad 1000 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	
pH-Wert	7.0

**LB<sub>0</sub>-Agar:**

Bacto Trypton	10,0g
Bacto Hefeextrakt	5,0g
NaCl	10,0g
Bacto Agar	18,0g
ad 1000 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	
pH-Wert	7.0

### 2.1.8 Eukaryotische Zellkulturen

**COS-7:**        Die COS-7 Zellkultur entstammt der afrikanischen grünen Meerkatze *Cercopithecus aethops*. Es handelt sich hierbei um stark adhärent wachsende Fibroblasten des

Nierengewebes, die aus einer Transformation mit dem SV40 Virus hervorgegangen sind und dadurch eine Replikation von Plasmiden mit dem SV40 Replikationsursprung erlauben (Gluzman, 1981).

**HEK-293:** HEK-293 Zellen entstammen dem embryonalen Gewebe menschlicher Nieren und zeichnen sich durch das Vorhandensein des humanen Adenovirus Typ V aus, wodurch HEK-293 Zellen CMV Promotoren für die Transkription von Proteinen nutzen können (Graham et al., 1977). Dieser ist beispielsweise ein Bestandteil von pcDNA3.1 Plasmiden.

**EBNA:** Bei den sogenannten EBNA Zellen handelt es sich um 293 humane embryonale Nierenzellen die zusätzlich das virale DNA-Bindeprotein EBNA1 enthalten, das für Regulation der Replikation im Replikationsursprung *OriP* des Epstein-Barr Virus (EBV) verantwortlich ist. Vektoren mit dem *OriP* des Epstein-Barr Virus, wie der Vektor pCEP-Pu2, können daher in EBNA Zellen zu einer verstärkten Expression von Proteinen genutzt werden.

**NG108-15:** Die NG108-15 Zellen wurden ursprünglich 108CC15 genannt und entstanden durch eine Fusion der N18TG2 Maus Neuroblastomazellen mit C6-BU-1 Ratten Gliomazellen und wurden zuerst von Bernd Hamprecht, 1977 beschrieben.

### 2.1.9 Eukaryotische Zellkulturmedien

Das eukaryotische Zellmedium bestand aus Kulturmedium der Firma PAA Laboratories (Cölbe, Deutschland): *Dulbeccos modified eagle medium high glucose* [4,5g/l], das zusätzlich mit 10% sterilem fötalen Kälberserum (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland), sowie einem Gemisch aus den beiden Antibiotika Penicillin und Streptomycin [10.000µg/ml] angereichert wurde. Das fötale Kälberserum wurde zuvor 30min auf 65°C erhitzt, um alle enthaltenden Enzyme zu inaktivieren.

### 2.1.10 Plasmide

**PTLN:** Der PTLN Vektor diente vor allem der Herstellung von mRNA für die Injektion in *Xenopus laevis* Oozyten nach dem sogenannten „run off“ Verfahren. Es handelt

sich hierbei um eine Abwandlung des pSP64T Vektors von Krieg und Melton, 1984, der zur Expressionssteigerung zusätzlich die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des  $\beta$ -Globingens aus *Xenopus laevis* enthält. Für die Abwandlung wurden mehrere zusätzliche Restriktionsstellen hinter die kodierenden Bereiche hinzugefügt, um die Linearisierung des Vektors zu erleichtern (Lorenz et al., 1996). PTLN Vektoren besitzen unter anderem einen SP6 Promotor für die Transkription von Genen und beinhalten die Möglichkeit zur Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin.

**PFROG:** Bei dem als PFROG bezeichneten Vektor handelt es sich um einen von Dr. W. Günther aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Thomas Jentsch (ZMNH, Hamburg) abgewandelten PCDNA3 Vektor der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland). Der PFROG Vektor enthält genau wie der PTLN Vektor die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des  $\beta$ -Globingens aus dem südafrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* zur Steigerung der Expression. Daneben wurden ebenfalls weitere Restriktionsstellen hinzugefügt, um die Linearisierung dieses Vektors durch verschiedene Enzyme zu erleichtern. PFROG wird zum einen für die Herstellung von mRNA zur Injektion in *Xenopus laevis* Oozyten benötigt, zum anderen können mit PFROG eukaryotische Zelllinien transient transfiziert werden. PFROG Vektoren besitzen unter anderem einen T7 Promotor für die Transkription von Genen und beinhalten die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin.

**PCDNA3:** Der als PCDNA3 bezeichnete Vektor der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) diente ausschließlich der transienten Transfektion eukaryotischer Zelllinien. PCDNA3 Vektoren beinhalten die Möglichkeit zur Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin.

**PET-30:** Bei dem als PET bekannten Vektorsystem der zu Merck (Darmstadt, Deutschland) gehörigen Firma Novagen (Madison, USA) handelt es sich um Vektoren zur gesteigerten Expression von Proteinen in unterschiedlichen *E. coli* Stämmen, beispielsweise BL21(DE3)pLysS, BLR21(DE3), RosettaBlue(DE3) oder NovaBlue(DE3)pLysS (Held et al., 2003). Sie wurden ursprünglich von Studier und seinen Kollegen konstruiert (Rosenberg et al., 1987; Studier et al., 1986; Studier et al., 1990) und besitzen neben einer Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin die Möglichkeit einer N-Terminalen Markierung mit einer Hexa Histidin Zielsequenz, die durch eine Enterokinase entfernt werden kann. Daneben haben PET-30 Vektoren eine Proteaseschnittstelle für Thrombin, sowie eine S-Protein Zielsequenz.

### 2.1.11 KCNQ Sequenzdaten

Derzeit sind für alle fünf KCNQ  $\alpha$ -Untereinheiten mehrere mRNA Sequenzen bekannt, die für das jeweilige Gen von KCNQ1 bis KCNQ5 kodieren. Deren Sequenzen sind frei im Internet unter der Homepage des amerikanischen Zentrums für biotechnologische Informationen (National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), kurz NCBI zugänglich. Um bei der Fülle an bereits veröffentlichten Daten schnell und einfach an die richtigen Sequenzen zu gelangen, wurde jede veröffentlichte mRNA Sequenz und jedes bekannte Gen aller verschiedenen Organismen durch Verwendung einer speziellen Nummerierung, der sogenannten „*accession number*“ katalogisiert, die im folgenden für jede in dieser Arbeit verwendete KCNQ  $\alpha$ -Untereinheit aufgeführt ist:

**KCNQ1: NM\_000218** Erstes Mitglied der KQT ähnlichen Unterfamilie spannungsabhängiger Kaliumkanäle (KCNQ1) von *homo sapiens*. Die hier beschriebene mRNA Sequenz steht für die erste Transkriptvariante und das resultierende Protein wird durch 2030 Nukleotide [cd] kodiert. [gi|32479526|ref|NM\\_000218.2|\[32479526\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|32479526|ref|NM_000218.2|[32479526])

**KCNQ2: NM\_004518** Zweites Mitglied der KQT ähnlichen Unterfamilie spannungsabhängiger Kaliumkanäle (KCNQ2) von *homo sapiens*. Die hier beschriebene mRNA Sequenz steht für die dritte Transkriptvariante und das resultierende Protein wird durch 2534 Nukleotide [cd] kodiert. [gi|88702787|ref|NM\\_004518.3|\[88702787\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|88702787|ref|NM_004518.3|[88702787])

**KCNQ3: NM\_004519** Drittes Mitglied der KQT ähnlichen Unterfamilie spannungsabhängiger Kaliumkanäle (KCNQ3) von *homo sapiens*. Das resultierende Protein wird durch 2618 Nukleotide [cd] kodiert. [gi|26638651|ref|NM\\_004519.2|\[26638651\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|26638651|ref|NM_004519.2|[26638651])

**KCNQ4: NM\_004700** Viertes Mitglied der KQT ähnlichen Unterfamilie spannungsabhängiger Kaliumkanäle (KCNQ4) von *homo sapiens*. Die hier beschriebene mRNA steht für die erste Transkriptvariante und das resultierende Protein wird durch 2087 Nukleotide [cd] kodiert. [gi|26638652|ref|NM\\_004700.2|\[26638652\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|26638652|ref|NM_004700.2|[26638652])

**KCNQ5: AF202977** Fünftes Mitglied der KQT ähnlichen Unterfamilie spannungsabhängiger Kaliumkanäle (KCNQ5) von *homo sapiens*. Die hier beschriebene mRNA kodiert für die erste Spleißvariante und das resultierende Protein wird durch 2694 Nukleotide [cd] kodiert. [gi|7798695|ref|AF202977.1|\[7798695\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|7798695|ref|AF202977.1|[7798695])

## 2.1.12 Übersicht über die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

### Primärantikörper

Antigen	Immunisierte Spezies, Ig-Klasse, Bezeichnung	Verdünnung für Western Blot Analyse	Referenz
$\alpha$ HA	Ratte, IgG, 3F10	1:1000	Roche, Mannheim, Deutschland
$\alpha$ FLAG	Maus, IgG, M2	1:500	Sigma-Aldrich, München Deutschland
$\alpha$ HIS	Maus, IgG, Anti(His) <sub>6</sub> -tag	1:1000	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
$\alpha$ KCNQ1	Kaninchen, IgG, H-130	1:200	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
$\alpha$ KCNQ2	Kaninchen, IgG, 391.1-5297	1:200	hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
$\alpha$ KCNQ2	Kaninchen, IgG, 392.1-5298	1:200	hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
$\alpha$ KCNQ3	Kaninchen, IgG, 393.1-5299	1:200	hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
$\alpha$ KCNQ3	Kaninchen, IgG, 394.1-5300	1:200	hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
$\alpha$ KCNQ4	Ziege, IgG, C-20	1:200	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
$\alpha$ KCNQ5	Ziege, IgG, C-17	1:200	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper. ( $\alpha$  = anti)

### Sekundärantikörper

Antigen	Kopplung	Verdünnung für Western Blot Analyse	Referenz
Esel $\alpha$ Kaninchen	Meerrettichperoxidase	1:10000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
Ziege $\alpha$ Ratte	Meerrettichperoxidase	1:10000	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Kaninchen $\alpha$ Ziege	Meerrettichperoxidase	1:10000	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Schaf $\alpha$ Maus	Meerrettichperoxidase	1:10000 (1:5000 für M2 AK)	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper. ( $\alpha$  = anti)



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Verwendung von mikrobiologischen Organismen

##### 2.2.1.1.1 Bakterienkultivierung

Die verwendeten *E. coli* Stämme wurden mit Antibiotika enthaltendem LB-Medium für mindestens achtzehn Stunden bei 37°C, Flüssigkulturen auf einem schwenkbaren Schüttler und Agarplatten im Brutschrank, kultiviert.

##### 2.2.1.1.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen zur Elektroporation wurden Stämme der Gattung *Escherichia* K12 verwendet. Für die Herstellung von Plasmiden für die transiente Transfektion eukaryotischer Zellkulturen und zur RNA-Synthese wurden ausschließlich XL1-Blue Zellen benutzt. Für die Produktion von rekombinantem Protein durch Elektroporation mit dem PET30 Vektor hingegen wurden Zellen der beiden Stämme BL21(DE3)pLysS und BLR(DE3) eingesetzt. Die Herstellung erfolgte für alle drei Stämme in gleicher Weise. Zuerst wurden bei -80°C gelagerte Zellkulturen der drei Stämme aufgetaut und zum Animpfen auf einer 10cm Agarplatte ausgestrichen. Diese diente als Vorkultur, von der eine Kolonie mit einer Impföse in einen mit 50ml gefüllten 200ml Erlenmeyerkolben überführt und bei 37°C über Nacht schüttelnd angezogen wurde. Von dieser Vorkultur wurden 20ml für eine weitere Anzucht in einem mit einem Liter gefülltem zwei Liter Erlenmeyerkolben verwendet. Bei Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase mit einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,8 wurden die Zellen durch eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei 5.000Upm in der J2-HS Zentrifuge (Beckman, Deutschland) bei einer Temperatur von 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 100ml auf 4°C vorgekühltes und autoklaviertes H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> aufgenommen und abermals mit 5.000Upm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgossen und verworfen und das Pellet nochmals mit H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> gewaschen. In einem letzten Waschschrift wurde das zuvor gebildete Pellet in 40ml zehnpromzentiger Glycinlösung aufgenommen, in Sarstedtröhrchen überführt und mit

3.200U<sub>pm</sub> bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und das Pellet in 4ml zehnpromzentiger Glycerinlösung resuspendiert und in Aliquots zu 50µl in Eppendorf 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.2.1.1.3 Bakterientransformation**

Die Transformation bezeichnet die Aufnahme von DNA-Molekülen durch Bakterien. Die gerichtete Aufnahme ausgewählter Plasmid-DNA durch geeignete Bakterienstämme, beispielsweise der verwendeten *E.coli* Stämme XL-1Blue oder auch BL21-pLysS erfolgte durch Elektroporation mit einem Genepulser (BioRad, Deutschland). Dabei werden die Bakterien einer Spannung von 2,5kV ausgesetzt, wodurch die DNA kurzzeitig verstärkt die Bakterienzellwand passieren kann.

Für die Transformation wurden 50µl Aliquots Bakterienlösung verwendet und mit 1,5µl Plasmid-DNA [~ 150ng/µl] in einer Elektroporationsküvette (PeqLab, Erlangen, D) vereint. Anschließend erfolgte der Spannungsimpuls. Die transformierten Bakterienzellen wurden in 1ml LB-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C vorinkubiert. Daraufhin wurden die Zellen für zwei Minuten bei Raumtemperatur mit 6.000U<sub>pm</sub> zentrifugiert. Um die Anzahl an Kolonien zu erhöhen, wurden 800µl des Überstandes entfernt und das Bakterienpellet in den verbleibenden 200µl resuspendiert. Der gesamte Ansatz wurde schließlich unter Verwendung geeigneter Antibiotika, je nach verwendetem Plasmid und entsprechender Antibiotikaresistenz auf LB-Agarplatten mit Hilfe eines Drigalski-Spatels ausplattiert. Die Anzucht von Kolonien erfolgte für mindestens sechzehn Stunden bei 37°C im Brutschrank (Memmert, Modell 200; Schwabach, Deutschland).

### **2.2.1.2 Plasmidpräparationen**

#### **2.2.1.2.1 Mini Plasmidpräparation**

Bei der „Mini-Präparation“ handelt es sich um eine einfache und schnelle Methode zur Isolierung von Plasmid DNA. Sie findet vor allem bei kleinen Mengen benötigter Plasmid DNA Anwendung, beispielsweise für die Sequenzierung. Eine Kolonie wurde mit einem Zahnstocher in 5ml LB<sub>0</sub>-Medium überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellen der

5ml Übernachtskultur wurden in 2ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und durch mehrmaliges zehnmütiges Zentrifugieren in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Deutschland) bei maximaler Geschwindigkeit, ungefähr 14.500g pelletiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen und die im Pellet befindlichen *Escherichia coli* Zellen mit der zu isolierenden Plasmid DNA wurden unter Verwendung des peqGold Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab, Erlangen, Deutschland) und nach dessen Protokoll präpariert.

#### **2.2.1.2.2 Midi Plasmidpräparation**

Nicht für alle Untersuchungen reichte die Minipräparation von Plasmid DNA. Beispielsweise für die Synthese der Matrizen für die *in vitro* RNA-Synthese wurden größere Konzentrationen an Plasmid DNA von ca. 6µg Plasmid DNA pro Ansatz benötigt.

Elektrokompetente *E. coli* XL1blue wurden mit 150 ng Plasmid DNA retransformiert und für 15min in 1ml LB<sub>0</sub>-Medium bei 37°C angezogen und anschließend in 100ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführt und über Nacht schüttelnd bei ebenfalls 37°C weiter kultiviert. Am nächsten Tag wurde in zwei aufeinander folgenden Zentrifugationsschritten die gesamten 100ml *E. coli* Lösung pelletiert und mit Hilfe des GENOMED Jetstar Plasmid Purification MIDI Kits (Löhne, Deutschland) und nach dessen Protokoll oder unter Verwendung des Pure Yield™ Plasmid Maxiprep System (Promega Corporation, Madison, Wi, USA) und dessen Protokoll präpariert.

### **2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.2.1 DNA Techniken**

##### **2.2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der DNA-Konzentrationen erfolgte unter Verwendung des GENE QUANT PRO Photometers (Cambridge, Großbritannien). Die Eichung des Photometers erfolgte durch Bestimmung des Nullwertes für das verwendete Lösungsmittel (in der Regel H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub>). Danach wurde die Probe in eine 100µl Quarzküvette überführt und bei den Wellenlängen 230nm, 260nm und 280nm gemessen. Die bei einem Absorptionsmaximum von 260nm

gemessenen Werte bezogen sich auf die Absorption von DNA-Molekülen. Für eine optische Dichte von 1 für die zu messende Wellenlänge von 260nm ergab sich eine Konzentration von 50µg/ml an doppelsträngiger DNA. Die relativen Werte für die Wellenlängen 230nm und 280nm zeigten den Grad der Verunreinigung durch Salze und Proteine und wurden vom relativen Wert für die DNA-Moleküle subtrahiert. Im Gegensatz zur DNA absorbieren aromatische Aminosäuren der Proteine, wie Tyrosin oder Tryptophan bei einer Wellenlänge von 280nm. Darüber hinaus lässt sich eine Verunreinigung der DNA-Lösung durch Proteine mittels einer photometrischen Messung bei einer Wellenlänge von 230nm quantitativ bestimmen. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die Peptiddoppelbindungen der Proteine und lassen dadurch Rückschlüsse über den Grad der Verunreinigung mit Proteinen zu.

### **2.2.2.1.2 Restriktionsverdau**

Es wurden insgesamt 2µg Plasmid DNA für einen Restriktionsverdau eingesetzt. Der Restriktionsverdau erfolgte mit Hilfe der von der Firma Fermentas gereinigten Restriktionsenzymen und den dazugehörigen Puffersystemen, entweder in Form von gleichzeitig ablaufenden Doppelverdauansätzen oder bei schlecht kombinierbaren Paaren an Restriktionsenzymen in nacheinander ablaufenden Reaktionen. Die Reaktionen wurden entweder durch Hitzeinaktivierung oder durch eine Agarosegelelektrophorese beendet.

### **2.2.2.1.3 Dephosphorylierung von geschnittener Plasmid DNA**

Nach erfolgtem Restriktionsverdau wurden die linearisierten Plasmid DNA Moleküle oftmals unter Verwendung von alkalischer Phosphatase aus dem Darm von Kälbern dephosphoryliert (Fermentas, Deutschland), um eine abermalige Vereinigung der beiden Enden der linearisierten Plasmid-DNA zu verhindern. Dazu wurden zusätzlich 2µl (1Unit/µl) der alkalischen Phosphatase zu dem 30µl Restriktionsansatz hinzugefügt und für eine Stunde bei 37°C zusammen mit der verdauten DNA inkubiert, um die 5'-Enden der Plasmid-DNA zu dephosphorylieren. Die dephosphorylierte Probe wurde anschließend durch eine Agarosegelelektrophorese von der alkalischen Phosphatase und den Restriktionsenzymen gereinigt.

### 2.2.2.1.4 Ligation von DNA Fragmenten

Die Ligation bezeichnet die Vereinigung zweier DNA-Moleküle mit Hilfe des Enzyms DNA-Ligase. Im Rahmen meiner Arbeit diente die Ligation der Vereinigung von geschnittenem linearisierten Vektor mit beliebiger ebenfalls mit den gleichen Enzymen geschnittener DNA mit dem Ziel der Synthese von doppelsträngiger, ringförmig geschlossener Plasmid-DNA. Meist handelt es sich bei der inserierten DNA um vollständige cDNAs, die die Information eines einzigen Genes beinhalten und unter Kontrolle eines bestimmten Promotors stehen.

Aufgrund der großen Anzahl an durchgeführten Ligationen wird im Folgenden nicht detaillierter auf einzelne Ligationen eingegangen und deshalb nur allgemein gültig zusammengefasst.

Als Insert dienten zumeist mit Endonuklease geschnittene PCR-Produkte oder aber auch bereits zuvor konstruierte Plasmide, die von einem Expressionssystem, beispielsweise für Expressionen in eukaryotischen Zellkulturen, in ein anderes, wie dem PTLN (Lorenz et al., 1996) Vektorsystem zur *in vitro* RNA Synthese, umkloniert werden sollten. Die Größenordnung der verwendeten Inserts betrug in der Regel 500 bis 1500 Basenpaare. Das Schneiden der Plasmid-DNA erfolgte in Ansätzen mit einem Volumen von 30µl, das der PCR-Produkte in 60µl. Nach erfolgtem Restriktionsverdau wurde der jeweilige Vektor durch Zugabe von 2µl (1U/µl) alkalischer Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIAP; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) zusätzlich dephosphoryliert, um ein Religieren des Vektors auf jeden Fall zu verhindern.

Für die Ligation wurden die verdauten Vektoren und Inserts zuerst auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und bei konstant 140V für 30 Minuten getrennt, um zwischen geschnittener und ungeschnittener DNA unterscheiden zu können. Gleichzeitig konnten dadurch vom Verdau übrig gebliebene Enzyme entfernt werden, die eventuell störend auf die Ligation wirken. Die DNA wurde in Form von kleinen Blöcken aus dem Gel isoliert und mit Hilfe des *High Pure PCR Product Purification Kits* der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) extrahiert. Nach erfolgter Extraktion wurden Vektor und Insert in 50µl H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> gelöst.

Für die Ligation wurden 7µl des geschnittenen Inserts mit 1µl des geschnittenen und dephosphorylierten Vektors unter Verwendung von 1µl 10x T4 DNA Ligasepuffer und 1µl T4 DNA-Ligase (200 U/µl; Fermentas) vereint und für mindestens vier Stunden oder über Nacht bei 17°C in einem Wasserbad inkubiert. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz mit 1µl derselben geschnittenen, dephosphorylierten Plasmid-DNA wie im eigentlichen Ligationsansatz, der mit 7µl H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub>, 1µl 10x T4 DNA Ligasepuffer und 1µl T4 DNA Ligase auf ein Reaktionsvolumen von 10µl aufgefüllt wurde. Da der geschnittene und dephosphorylierte

Vektor selbst bei Anwesenheit einer DNA-Ligase nicht wieder religieren kann, sollte eine positive Kontrolle nach der Transformation aufgrund der verwendeten Antibiotika enthaltenen Agarplatten keine Klone zeigen.

### **2.2.2.1.5 Agarosegelelektrophorese**

Die Analyse der Desoxyribonukleinsäure, sowohl der PCR Fragmente als auch der geschnittenen und ungeschnittenen Plasmid DNA, erfolgte durch horizontale Elektrophorese anhand von Agarosegelen (1 % bis 1,5 %).

Für ein 1,5% Agarosegel wurden 2,25g Agarose mit 150ml TAE Puffer mit Hilfe einer Mikrowelle zum Sieden gebracht und weiter kurz aufgeköcht. Die Lösung wurde auf eine Temperatur von 55°C bis 60°C abgekühlt und mit 15µl Ethidiumbromid (10mg/ml) versetzt, kurz geschwenkt und anschließend in die dafür vorgesehene Apparatur gefüllt. Für die Apparatur wurden zwei Käme mit 14 Taschen verwendet. Zum schnellen Abkühlen wurde das Gel im Kühlraum bei 4°C gegossen und war bereits nach 10min vollständig erstarrt. Für die Agarose Gelelektrophorese wurden die Taschen mit bis zu 60µl Probe befüllt.

Als Standard diente der 1kb DNA Marker von Invitrogen (Karlsruhe, Germany). Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE Puffer für 30min bei Raumtemperatur und 140V. Nach erfolgtem Gellauf wurde das Agarosegel zuerst auf einem Leuchtschirm mit weniger intensiver ultraviolettem Licht bei einer Wellenlänge von 366nm (INTAS; Göttingen, Deutschland) betrachtet. DNA Banden mit der erwarteten Größe wurden in Form von kleinen Gelblöcken aus dem Agarosegel geschnitten und zur späteren Verwendung in 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Das restliche Gel diente nun ausschließlich der Dokumentation.

Die weitere Auswertung des übrig gebliebenen Gels erfolgte unter einem Leuchtschirm (INTAS; Göttingen, Deutschland) bei intensiverem ultraviolettem Licht ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ), wodurch die im Gel verbliebene DNA für weitere Nutzung aufgrund der hohen Strahlung unbrauchbar wurde. Anschließend wurden die Ergebnisse mit Hilfe eines Video Graphic Printer (P91D, Mitsubishi) dokumentiert.

### **2.2.2.1.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Die Isolierung der DNA aus den Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des *High Pure PCR Product Purification Kits* der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) und nach deren Protokoll. Es wurde ein etwa halber Zentimeter großer Block aus dem Agarosegel geschnitten, der die zu isolierende DNA enthielt. Anschließend wurde der Gelblock unter Zugabe des im Kit enthaltenen Bindepuffers in einem Eppendorf Reaktionsgefäß für ungefähr 10min auf 55°C erwärmt, bis dieser aufgelöst war. Danach wurde 150µl Isopropanol hinzugefügt, um die DNA zu präzipitieren. Daraufhin wurde der Ansatz auf eine speziell DNA bindende Säule übertragen und für 1min mit maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf Tischzentrifuge 5415C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Matrix zweimal mit dem im Kit beigefügten Ethanol, enthaltenden Waschpuffer, durch abermalige einminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit zuerst mit 500µl, dann nochmals mit 200µl gewaschen. Die Elution der DNA aus der Matrix der Säule erfolgte durch Zugabe von 50µl H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub>. Nach einer einminütigen Einwirkdauer wurde die in H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> gelöste DNA durch eine ebenfalls einminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit separiert und für eine längerfristige Lagerung bei -20°C eingefroren.

### **2.2.2.1.7 Sequenzierung**

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA für die neu konstruierten und klonierten Untereinheiten der zu untersuchenden KCNQ Kanäle erfolgte anhand von lyophilisierten Proben. Jeweils 1µg bis 1,5µg an der zu sequenzierenden und in Wasser gelösten Plasmid-DNA wurde in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei einer Temperatur von 55°C getrocknet. Anschließend wurden die Proben von MWG-Biotech AG (Martinsried, Deutschland) sequenziert. Die Auswertung der übermittelten Daten erfolgte unter Verwendung des Programms DNA Star (Lasergene).

### **2.2.2.2 PCR Techniken**

#### **2.2.2.2.1 Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion -englisch auch *polymerase chain reaction* (PCR)- ist eine Methode zur *in vitro* Synthese von DNA Molekülen unter Verwendung kurzer

Oligonukleotide, die auch als „*Primer*“ bezeichnet werden. Diese binden entsprechend der komplementären Basenpaarung an die komplementären Stellen der so genannten „*template*“ DNA Stränge, an denen sich die DNA Polymerase orientiert. Zwischen den Primern wird nun gemäß der Entfernung der beiden Oligonukleotide zueinander mit Hilfe der DNA abhängigen DNA Polymerasen in 5′→3′ Richtung ein Stück DNA amplifiziert, das heißt neu synthetisiert. Zu diesem Zweck wurden speziell für jedes Gen ein vorwärts gerichteter und ein gegenläufiger Primer ausgesucht. Nach der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988) erhält man auf diese Art und Weise je nach Position der Primer an dem ursprünglichen DNA Strang für jedes Gen, Fragmente mit genau definierter Länge.

Für diese Arbeit wurden DNA abhängige DNA Polymerasen aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA Polymerase) oder dem hyperthermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* (*Pfu* DNA Polymerase) verwendet. Die *Taq* DNA Polymerase fand aufgrund der fehlenden Fehler-Korrektur-Funktion (englisch, „*proof reading*“), was zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit an Punktmutationen durch den Einbau von falschen Nukleotiden in die zu amplifizierenden PCR Fragmente führt, nur Verwendung für die so genannten Kolonie-PCRs.

PCRs zur Erzeugung von Punktmutanten und DNA Fragmente, die in weiteren Schritten noch wichtig für die Klonierung unterschiedlicher chimärer Konstrukte waren, wurden ausschließlich unter Verwendung der so genannten *Pfu* DNA Polymerase durchgeführt. Diese besitzt im Gegensatz zur *Taq* DNA Polymerase eine „*proof reading*“ Funktion, so dass fehlerhafte DNA Synthese auf ein Minimum eingeschränkt werden konnte. Ein typischer PCR Ansatz unter Verwendung der DNA abhängigen *Pfu* DNA Polymerase sah dabei wie folgt aus:

<b>2µl</b>	<b>vorwärts gerichteter Primer</b>	<b>(10µM)</b>
<b>2µl</b>	<b>rückwärts gerichteter Primer</b>	<b>(10µM)</b>
<b>4µl</b>	<b>dNTP Mix (2,5µM je Nukleotid; Fermentas, D)</b>	
<b>5µl</b>	<b>10 x <i>Pfu</i> DNA Polymerase Puffer (Fermentas, D)</b>	
<b>1µl</b>	<b><i>Pfu</i> DNA Polymerase 1U/µl (Fermentas, D)</b>	
<b>5µl</b>	<b>template DNA (~50ng bis 100ng)</b>	
<b>2,5µl</b>	<b>DMSO</b>	
<b>ad 50µl</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub></b>	

Die Polymerase Ketten Reaktion erfolgte in 200µl PCR Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Deutschland) und unter Verwendung eines GenAmp PCR System 2400 Thermocyclers (Perkin-Elmer, USA) nach folgendem Programm:



<b>Denaturierung der Probe:</b>	<b>95°C 5min</b>	
<b>Denaturierung der DNA:</b>	<b>95°C 35s</b>	} 36 Zyklen
<b>Anlagerung der Primer:</b>	<b>53°C 35s</b>	
<b>Polymerisation:</b>	<b>72°C x<sup>*1</sup>s</b>	
<b>Abschließende Polymerisation:</b>	<b>72°C 7min</b>	
<b>Aufbewahrung der PCR-Produkte:</b>	<b>10°C ∞</b>	

x<sup>\*1</sup> = Die Zeiten für die Polymerisation waren unterschiedlich je nach zu amplifizierendem PCR Fragment. Für die *Pfu* DNA Polymerase galt als Faustregel eine Polymerisation von 500 Nukleotiden pro Minute.

### 2.2.2.2 Einführen von Punktmutationen

Das Einführen von Punktmutationen geschah auf Ebene der DNA-Moleküle durch eine Veränderung der Basentriplets für die kodierenden Aminosäuren mit Hilfe von rekombinanter PCR nach Higuchi, 1990. In der Regel wurden pro Punktmutation zwei 18 bis 24 Nucleotide lange Startnucleotide (*Primer*) für die *in vitro* DNA Synthese konstruiert, die in ihrer Mitte gelegen die veränderte Nucleotidsequenz enthielten. Diese waren zum einen komplementär zum vorwärts als auch zum rückwärts laufenden Strang des zu verändernden DNA-Moleküls. Bei den darauffolgenden rekombinanten Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurden in zwei unabhängig voneinander ablaufenden PCR Reaktionen, PCR Fragmente einer Größe von ungefähr 300 bis 500 Nucleotiden synthetisiert, wobei jeweils einer der verwendeten Primer ein Mutageneseprimer, der jeweils zweite ein Stück stromaufwärts oder stromabwärts bindende Primer keine Veränderung hatte. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der neu synthetisierten PCR Fragmente in einem Agarosegel. In einer zweiten PCR Reaktion wurden die beiden PCR Fragmente der ersten PCR Reaktionen mit den jeweils stromabwärts und stromaufwärts gerichteten nicht Mutageneseprimern vereint und durch das gleichzeitige Überlappen der beiden Mutageneseprimer ein gemeinsames neues PCR Fragment von ungefähr 600 bis 1000 Nucleotiden produziert. Nach der Reinigung aus dem Agarosegel konnte das über eine Fusion der beiden ersten PCR Fragmente entstandene zweite PCR Fragment mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und in einen Vektor mit der zu verändernden DNA- bzw. Aminosäuresequenz hinein ligiert werden.

### 2.2.2.2.3 Kolonie PCR

Nach erfolgter Ligation wurde der richtig gerichtete Einbau des DNA Inserts in den Zielvektor mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction) anhand von transformierten *E.coli* XL-1Blue Bakterienkolonien überprüft, weswegen im Weiteren von einer Kolonie PCR gesprochen wird. Bei der Kolonie PCR bindet zum einen ein Primer im geschnittenen Vektor, ein zweiter Primer bindet komplementär und entgegen gerichtet zum ersten in dem zu integrierenden Insert. Vektor und Insert wurden mit denselben Restriktionsendonukleasen verdaut, um einen gezielten Einbau zu garantieren. Nur wenn Vektor und Insert in der richtigen Orientierung zueinander durch die DNA-Ligase verbunden wurden, ergab sich durch die anschließend durchgeführte Kolonie PCR ein Fragment zuvor mit Hilfe geeigneter Vektorkarten bestimmter Größe.

Nach jeder erfolgreich durchgeführten Transformation wurden die unterschiedlichen Kolonien zuerst unter Verwendung steriler Zahnstocher gepickt und anschließend unter kreisenden Bewegungen in zuvor vorbereitete 200µl PCR Reaktionsgefäße und den darin befindlichen 25µl PCR-Reaktionsansatz eingetaucht, um einige Bakterien abzustreifen. Diese wurden in der ersten Phase der PCR durch das Erwärmen auf 95°C abgetötet und die freiwerdende Bakterien DNA diente als Ausgangsmaterial für die nun folgende PCR:

<b>Denaturierung der Probe:</b>	<b>95°C 5min</b>	
<b>Denaturierung der DNA:</b>	<b>95°C 35s</b>	} 36 Zyklen
<b>Anlagerung der Primer:</b>	<b>53°C 35s</b>	
<b>Polymerisation:</b>	<b>72°C x<sup>*1</sup>s</b>	
<b>Abschließende Polymerisation:</b>	<b>72°C 7 min</b>	
<b>Aufbewahrung der PCR-Produkte:</b>	<b>10°C ∞</b>	

x<sup>\*1</sup> = Die Zeiten für die Polymerisation waren unterschiedlich je nach zu amplifizierendem PCR Fragment. Für die *Taq* DNA Polymerase galt als Faustregel eine Polymerisation von 1000 Nukleotiden pro Minute.

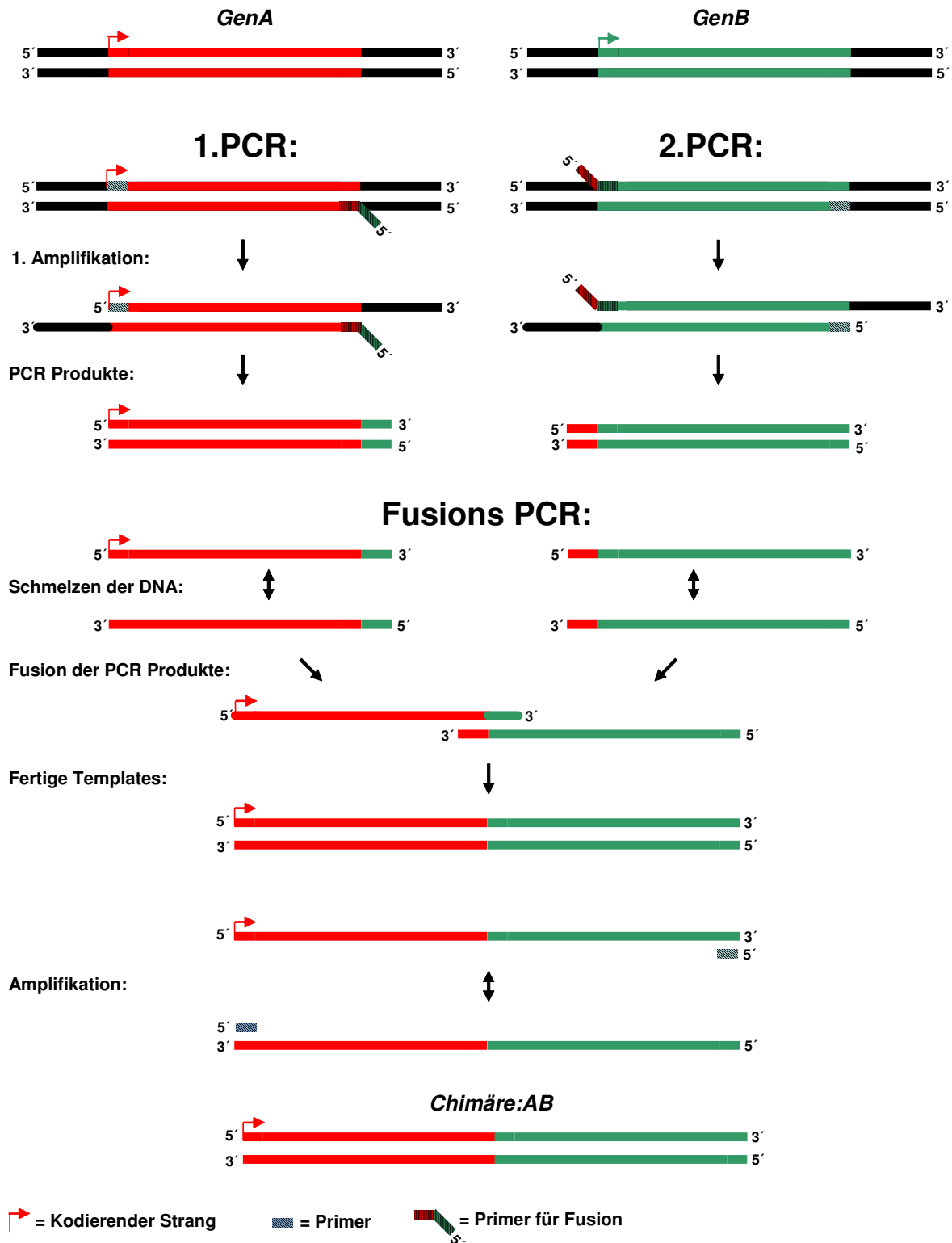
Ein typischer Kolonie PCR Ansatz sah wie folgt aus:

<b>* eine Zahnstocherspitze an Bakterien (~100ng bis 150ng template DNA)</b>		
<b>2µl</b>	<b>vorwärts gerichteter Primer</b>	<b>(10µM)</b>
<b>2µl</b>	<b>rückwärts gerichteter Primer</b>	<b>(10µM)</b>
<b>4µl</b>	<b>dNTP Mix (2,5µM je Nukleotid; Fermentas, D)</b>	
<b>1µl</b>	<b><i>Taq</i> DNA Polymerase 1U/µl (Fermentas, D)</b>	
<b>2,5µl</b>	<b>10 x <i>Taq</i> DNA Polymerase Puffer (Fermentas, D)</b>	
<b>ad 25µl</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub></b>	

Die Zahnstocher wurden nach dem Ansetzen der Kolonie PCR in 10ml Reagenzröhrchen (Schott, Deutschland) überführt und die Bakterien in 5ml ampicillinhaltigem (100µg/ml) LB-Medium über Nacht bei 37°C unter Schütteln herangezogen. Dank der Kolonie PCR konnte im Fall positiver Signale direkt für die positiven Klone der entsprechenden 10ml Reagenzröhrchen eine Mini Plasmid DNA Präparationen unter Verwendung des peqGOLD Plasmid Miniprep Kits I (PeqLab, Erlangen, Deutschland) durchgeführt werden.

#### **2.2.2.2.4 Fusions PCR**

Die Synthese von Chimären erfolgte ebenfalls durch rekombinante PCR Techniken. Dabei wurden Primer (Sigma-Aldrich) zur Fusion von Genen in einer Größe von 36 Nukleotiden konstruiert, wobei jeweils 18 Nukleotide mit der Sequenz der einen *KCNQ* Untereinheit und 18 Nukleotide mit der zu fusionierenden Sequenz einer zweiten *KCNQ* Untereinheit übereinstimmten. In einer ersten PCR Reaktion wurden wiederum PCR Fragmente in einer Größe von 300 bis 500 Nukleotiden synthetisiert, bei denen entweder der stromaufwärts oder stromabwärts gerichtete Primer der zu amplifizierenden Sequenz, der zweite jedoch dem stromabwärts bzw. stromaufwärts Fusionsprimer entsprach (Abbildung 2.1). Als Matrize diente separat für jede der ersten PCR Reaktionen eingesetzte Plasmid-DNA der beiden zu fusionierenden *KCNQ* Untereinheiten. Nach erfolgter PCR wurden die beiden Fragmente mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und aus dem Gel gelöst. Sie dienten als Matrize für eine zweite PCR Reaktion, bei der lediglich die beiden PCR Produkte der ersten PCR und die beiden jeweils außerhalb gelegenen und mit der ursprünglichen Sequenz übereinstimmenden Primer eingesetzt wurden. Beide Fusionsprimer der ersten PCR waren komplementär zueinander und überlappten auf ganzer Länge, so dass mit Hilfe der einfachen stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Primer eine Vervielfachung der beiden fusionierten Fragmente der ersten PCR Reaktionen geschehen konnte. Bei einigen Chimären wurden sogar bis zu drei PCR Fragmente gleichzeitig miteinander fusioniert, wobei in der zweiten PCR Reaktion die PCR Produkte der ersten PCR Reaktionen als Matrize dienten, und nur die zwei Primer der beiden äußeren PCR Fragmente der ersten PCR Reaktion als Matrize dienten. Anschließend konnten die über eine Fusion unterschiedlicher PCR Fragmente entstandenen Fragmente durch das Schneiden mit geeigneten Restriktionsenzymen in den zu synthetisierenden Vektor ligiert werden, so dass am Ende ein neu synthetisiertes chimäres Protein, bestehend aus unterschiedlichen *KCNQ* Untereinheiten, vorlag.



**Abbildung 2.1: Schematische Übersicht über die angewandte Fusions PCR Technik.** Teile von GenA werden in einer 1.PCR amplifiziert. Gleichzeitig wird ein weiterer Teilbereich von GenB amplifiziert. Bei der darauffolgenden Fusions PCR lagern sich die Produkte der 1. und 2. PCR zusammen und bilden das Template für die Fusions PCR, bei der das zu fusionierte Genprodukt vervielfacht wird. Die beiden ursprünglichen Gene A und B sind in rot und grün dargestellt. Daneben sind die Primer für die PCR Reaktionen schraffiert dargestellt. Die in der Regel über einen Bereich von 36 Nukleotiden überlappenden Fusions-Primer sind in rot/grün mit Schraffur abgebildet. Die Richtung des kodierenden Stranges wurde mit einem roten bzw. grünen Pfeil kenntlich gemacht.

### 2.2.2.3 RNA Techniken

#### 2.2.2.3.1 *In vitro* RNA Synthese

Die Herstellung der Matrizen erfolgte durch Linearisierung der Plasmid DNA mit Hilfe geeigneter Enzyme und nach dem von dem Hersteller vorgegebenen Protokoll. Für die Hydrolyse der Plasmid DNA wurde in der Regel die Restriktionsendonuklease *HpaI* (Fermentas, Deutschland) benutzt. 6µg des Expressionsvektors wurde in einem 30µl Gesamtansatz mit 1µl *HpaI* bei 37°C für eine Stunde hydrolysiert, so dass letztendlich ein linearisiertes Plasmid entstand. Die Restriktionsschnittstelle befand sich immer von dem zu transkribierendem Gen stromabwärts gerichtet. Für die Herstellung wurden mMessage mMachine<sup>®</sup> Kits der Firma Ambion (Austin, Vereinigte Staaten von Amerika) verwendet, die sich lediglich in den zu verwendenden Promotoren und DNA abhängigen RNA Polymerasen unterschieden. Beispielsweise wurde für die RNA Synthese der PFROG Vektoren das T7 RNA Synthese Kit eingesetzt, da der PFROG Vektor lediglich einen T7 Promotor vor der eigentlichen „multiple cloning site“, dem Ort im Plasmid an dem vermehrt Restriktionsendonukleasen aktiv und gleichzeitig die zu untersuchenden Gene inseriert werden, besitzt. Nur unter Verwendung einer DNA abhängigen RNA Polymerase aus dem T7 Lambdaphagen konnte das zu untersuchende Gen transkribiert werden. Die Synthese erfolgte dabei nach dem so genannten „run off“ Verfahren, bei dem die DNA abhängige RNA Polymerase beginnend am geeigneten Promotor anfängt, die Information der vorliegenden DNA in cRNA umzuschreiben. Die Transkription endet hingegen nicht wie in den Organismen üblich über eine Rho abhängige bzw. Rho unabhängige Termination, sondern durch einfaches Herabgleiten der DNA abhängigen RNA Polymerase von dem zu amplifizierenden DNA Strang an der zuvor mit Hilfe der verwendeten Restriktionsendonuklease hydrolysierten *HpaI* Schnittstelle. Das Enzym steht nach dem erfolgten Herabgleiten für weitere Synthesen zur Verfügung.

Für die RNA Synthese aus PTLN Vektoren wurde im Gegensatz zum zuvor beschriebenen PFROG Vektor ein Sp6 Kit der Firma Ambion mit der dazugehörigen DNA abhängigen Sp6 RNA Polymerase angewendet.

Der geschnittene Vektor wurde unter Verwendung des *High Pure PCR Product Purification Kits* (Roche) aufgereinigt und in 50µl H<sub>2</sub>O<sub>MiliQ</sub> aufgenommen. 3µl der linearisierten Matrize wurden mit 1µl des im Umfang des RNA Synthese Kits enthaltenen 10x Puffers und 5µl des mitgelieferten 2x dNTP Mix mit 1µl der DNA abhängigen RNA Polymerase vermischt, und

für exakt 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die *in vitro* Transkription durch Zugabe von 15µl RNase freiem DEPC Wassers und gleichzeitiger Zugabe von 12,5µl der ebenfalls im Kit befindlichen LiCl<sub>2</sub> Lösung gestoppt und der Ansatz bei -20°C für mindestens 30min eingefroren. Als nächstes wurde der Ansatz für 20min bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit in der Biofuge Fresco (Heraeus, Deutschland) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 250µl eiskaltem 70%igen Ethanol aufgenommen und erneut für 10min bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet bei 37°C für 30min getrocknet und daraufhin in 13µl RNase freien DEPC Wasser aufgenommen. 1 µl der RNA Lösung wurden zur Überprüfung der Beständigkeit der synthetisierten RNAs auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 140V für genau 20min aufgetrennt. Als Marker diente wie für die DNA Proben der 1kb Größenstandard der Firma Invitrogen. Aufgrund der sich ausgebildeten Sekundärstrukturen hatte intakte RNA eine Größe von ungefähr 1000 bis 1500 Nukleotiden je nach verwendeter Matrize. 3µl Aliquots mit einer Konzentration von 200ng/µl wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte ebenfalls wie für DNA Proben unter Anwendung photometrischer Messungen.

## **2.2.3 Biochemische Methoden**

### **2.2.3.1 Membranpräparationen**

#### **2.2.3.1.1 Membranpräparation von eukaryotischen Zellkulturen**

Die Zellernte erfolgte mit Hilfe von Zellschabern (TPP-Techno Plastic Products, Schweiz). Zuerst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 5ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde 1ml PBS<sub>complete</sub> verwendet, um die Zellen mit dem Schaber vom Plattenboden zu lösen. Die gelösten Zellen wurden in ein 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Deutschland) überführt und anschließend für 10 Minuten bei 4°C mit 12.000Upm zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge 5415c). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in 300µl 1 x PBS<sub>complete</sub> aufgenommen. Die Zellen wurden weiterhin mit Hilfe eines Ultraschallstabs aufgebrochen (KONTES - micro ultrasonic disrupter, USA), anschließend auf Eis gelagert. Nach einer weiteren zehnminütigen Zentrifugation bei 4°C mit 5000Upm wurde diesmal das Pellet verworfen und nur der Überstand aufbewahrt. Die

Proteinbestimmung der in 1x PBS gelösten Proteine erfolgte nach Bradford. 200µl Bradford-färbelösung (BioRad, Deutschland) wurden mit 10µl einer 1:20 verdünnten Proteinlösung des Gesamtextraktes vermischt und die Konzentration in 96-Loch-Kulturplatten (Sarstedt, Deutschland) mit Hilfe eines Plattenlesegerätes (TECAN, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 595nm ermittelt.

### **2.2.3.1.2 Membranpräparation von *Xenopus laevis* Oozyten**

Nach einer zwei bis dreitägigen Ruhephase in ND96-Lösung bei einer Temperatur von 17°C wurden die mit RNA injizierten *Xenopus* Oozyten entweder erst physiologisch untersucht oder aber auch direkt für Western Blot Analysen aufbereitet. Dazu wurden die Oozyten zuerst in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit 10µl PBS<sub>complete</sub> pro Oozyte versehen. Unter Verwendung einer 200µl Pipette (Eppendorf, Deutschland) wurden die Oozyten durch mehrmaliges auf und abpipettieren homogenisiert. Daraufhin wurde das Homogenat für 2min bei 2.000Upm in einer Kühlzentrifuge (Heraeus, Deutschland) bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet mit dem Dotter wurde verworfen und nur der Überstand wurde in zwei darauffolgenden Zentrifugationsschritten für abermals 2min bei 2.000Upm bei 4°C zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Volumen des gereinigten Homogenates mit PBS<sub>complete</sub> auf 10µl pro *Xenopus* Oozyte eingestellt und zusätzlich mit weiteren 10µl 2x Solubilisierungspuffer für SDS-Gelelektrophoresen pro Oozyte versehen. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei 55°C unter den reduzierenden Bedingungen des Solubilisierungspuffers waren die Proben bereit zum Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamidgel.

### **2.2.3.2 Experimente zur Interaktion von Proteinen**

#### **2.2.3.2.1 Immunpräzipitation**

Für die Immunpräzipitationen wurden ausschließlich mit 0,1% TritonX-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in PBS gelöstes Protein, aus zusätzlich mit milden Ultraschall aufgebroschenen Zellen verwendet. 250µg Protein wurde in 250µl PBS aufgenommen und über Nacht über Kopf schüttelnd bei 4°C mit 50µl G-Sepharose (Perbio Science) und 7µl

Antikörper [ $\sim 100\text{ng}/\mu\text{l}$ ] zusammen inkubiert. Die G-Sepharose wurde zuvor dreimal mit  $500\mu\text{l}$  PBS gewaschen und jeweils bei  $7.500\text{Upm}$  abzentrifugiert. Nach erfolgter Inkubation wurde der Immunpräzipitationsansatz bei  $4^\circ\text{C}$  mit  $7.500\text{Upm}$  abzentrifugiert. Der Überstand nach der Präzipitation wurde aufbewahrt und bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Das verbleibende Pellet hingegen wurde insgesamt fünfmal mit Proteaseinhibitor (Complete; Roche, Mannheim, Deutschland) enthaltendem PBS gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Jeweils  $500\mu\text{l}$  an PBS wurden dabei pro Waschschrift zu der G-Sepharose hinzugefügt. Die G-Sepharose und der Waschpuffer wurden bei jedem Waschschrift für jeweils  $5\text{min}$  über Kopf schüttelnd bei  $4^\circ\text{C}$  vereinigt, bevor erneut bei  $7.500\text{Upm}$  zentrifugiert wurde. Nach dem fünften Waschschrift wurde der Überstand sehr genau abgenommen und das verbleibende Pellet in  $50\mu\text{l}$  2x Auftragspuffer für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgenommen und für  $10\text{min}$  bei  $55^\circ\text{C}$  denaturiert. Anschließend konnte das präzipitierte Protein für Untersuchungen durch SDS-Gelelektrophoresen verwendet werden.

### **2.2.3.2.2 Koimmunpräzipitation**

Für die Koimmunpräzipitationsexperimente wurden  $10\text{cm}$  Kulturschalen mit COS-7 Zellen verwendet. Jeweils  $2\mu\text{g}$  Plasmid DNA von KCNQ2 mit N-terminal gelegener Flag Erkennungssequenz wurden mit  $0,5\mu\text{g}$  der zu untersuchenden Plasmid-DNA von KCNQ1, KCNQ3 und den Chimären von KCNQ1 und KCNQ3, unter Verwendung von FuGENE 6 (Roche, Deutschland) gemeinsam transfiziert. KCNQ1, KCNQ3 und die Chimären von KCNQ1 und KCNQ3 hatten zusätzlich die neun Aminosäuren lange und vom Hämagglutinin Protein HA1 des humanen Influenza Virus stammende Erkennungssequenz YPYDVPDYA an den C-Terminus angefügt (Wilson et al., 1984).

Nach einem zweitägigen Wachstum bei  $37^\circ\text{C}$  konnten die transient transfizierten COS-7 Zellen geerntet werden. Der Aufbruch der Zellen geschah durch milde Ultraschallbehandlung. Zellkerne und Zelltrümmer wurden durch eine zehnmünütige Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge bei  $1.000\text{g}$  (Hereaus, Deutschland) entfernt. Der Überstand wurde in einer Ultrazentrifuge (Beckman, Deutschland) bei  $100.000\text{g}$  für  $30\text{min}$  bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in einem Lysispuffer [ $120\text{mM}$  NaCl,  $1\text{mM}$  EGTA,  $5\text{mM}$  DTT,  $50\text{mM}$  Tris/HCl pH 8.0,  $0,5\%$  NP-40,  $10\%$  Glycerin und Complete] durch wiederholtes mildes Ultraschallen resuspendiert, der Überstand hingegen wurde verworfen.  $250\mu\text{g}$  gelöstes Protein wurden mit  $7,5\mu\text{l}$  des gegen die Hämagglutininsequenz gerichteten monoklonalen Antikörpers



3F10 (Roche, Deutschland) über Nacht und über Kopf drehend bei 4°C inkubiert. Für die Präzipitation wurden 50µl Protein G-Sepharose durch zweimaliges fünfminütiges Waschen in Lysispuffer vorbereitet, und anschließend dem Ansatz aus 3F10 Antikörper und Proteinlösung hinzugefügt. Nach einer halbstündigen Inkubation wurde der Ansatz für 2min bei 7.500Upm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die sedimentierte Protein G-Sepharose wurde in 500µl Lysispuffer aufgenommen und für 5min bei 4°C über Kopf schüttelnd gewaschen. Nach vier weiteren Waschschritten in Lysispuffer wurde die G-Sepharose in 50µl 2x Auftragspuffer für SDS-Gelelektrophoresen aufgenommen und für 10min auf 55°C erwärmt. 20µl des Präzipitates wurden auf ein achtprozentiges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und durch eine Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Charakterisierung des separierten Präzipitates durch Western Blot Analyse. Für die Detektion der Interaktion wurde der Blot mit dem monoklonalen M2 Antikörper (Sigma-Aldrich, Deutschland) gegen die Flag Erkennungssequenz von KCNQ2 untersucht. Der monoklonale M2 Antikörper wurde dabei in einer Verdünnung von 1:500, der sekundäre Schaf Anti-Maus Antikörper (Jackson Immuno Research) wurde 1:5000 eingesetzt.

#### **2.2.3.2.3 Reinigung von Zelleinschlusskörpern aus *E.coli***

Die Transformation mit dem PET30 Vektor der für die Produktion von rekombinantem Protein verwendeten *E.coli* K12 Stämme BLR(DE3) und BL21(DE3)pLysS erfolgte durch Elektroporation. Die Kultivierung geschah unter Verwendung des Antibiotikums Kanamycin. Zuerst wurden mit Antibiotikum versehene 10cm Agarplatten (Sarstedt, Deutschland) für die Kultivierung von Vorkulturen verwendet. Eine Kolonie diente zum Anziehen einer 50ml Vorkultur. Anschließend wurden 1 Liter Erlenmeyerkolben mit 250ml LB-Medium und dem dazugehörigen Antibiotikum Kanamycin mit den entsprechenden Vorkulturen der beiden Expressionsstämme für die Expression des rekombinanten Proteins angeimpft. Bei Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase mit einer optischen Dichte von 0,3 bis 0,5 wurde durch die gezielte Zugabe von 1M IPTG die Expression des zu amplifizierenden Proteins induziert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 600nm. Die Kultur wurde über Nacht bei 23°C herangezogen und am nächsten Tag geerntet. Dazu wurde die Bakterienkultur in Plastikzentrifugenbecher überführt und bei 14.000Upm für 30min in einer J2-HS Zentrifuge der Firma Beckman unter Verwendung des JA-14 Rotors zentrifugiert. Die

Zellen wurden in 50ml Lysispuffer aufgenommen, mit Hilfe eines Ultraschallstabs aufgebrochen (KONTES - micro ultrasonic disrupter, USA) und anschließend auf Eis gelagert. Die aufgebrochenen und in Lysispuffer befindlichen *E.coli* Zellen wurden weiter mit RNase [10µg/ml] und DNaseI [5µg/ml] versetzt und auf Eis stehend für weitere 60min inkubiert. Die Probe wurde mit 7.500Upm für 10min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50ml Waschpuffer durch mehrmaliges Auf- und Abziehen resuspendiert, kurz mit dem Ultraschallstab behandelt und abermals für 10min bei 7.500Upm zentrifugiert. Insgesamt vier Waschschritte wurden durchgeführt. Nach dem letzten Waschschritt wurde das gewonnene Pellet bei -20°C bis zur späteren Verwendung eingefroren.

#### **2.2.3.2.4 Vernetzung von Proteinen**

Das Quervernetzen von Proteinen ist eine Methode zur Untersuchung von Proteininteraktionen. Dabei wird mit Hilfe einer homobifunktionalen Quervernetzungs substanz (Cross-Linker) eine Verbindung zwischen zwei zu untersuchenden Proteinen hergestellt. Aufgrund der geringen Größe der Cross-Linker wird der Abstand zwischen beiden Proteinen auf ein Minimum von 11Å bis 12Å reduziert, so dass eine Interaktion ähnlich der nativen Wechselwirkung beider Proteine zustande kommt.

Für die Quervernetzung wurde der homobifunktionale und hydrophile, nicht durch Reduktionsmittel spaltbare, spezifisch an frei zugängliche Aminogruppen bindende Cross-Linker *Disuccinimidylsuberate*, kurz DSS (Pierce, Deutschland) verwendet, der in einer Konzentration von 2,5mM in DMSO angesetzt wurde. Für einen Quervernetzungsansatz wurden zunächst 20mg Protein aus aufbereiteten Zelleinschlusskörpern vom *E.coli* Stamm BLR oder BL21-pLysS in 350µl PBS<sub>complete</sub> durch kurzzeitige Ultraschalleinwirkung gelöst und anschließend für 60min auf 60°C erwärmt. Durch eine darauffolgende zweiminütige Zentrifugation bei 1.000g wurden die unlöslichen Bestandteile von dem in PBS<sub>complete</sub> gelösten rekombinanten Protein getrennt. 27µl des Proteins wurden mit 3µl DSS [2,5mM] vereint, um die Quervernetzung zu starten. Der Grad der Vernetzung wurde durch die Einwirkdauer des DSS und nicht über dessen Konzentration bestimmt. Es wurde eine willkürliche Zeitreihe von 1min, 2min, 5min, 15min, 30min, 45min und 60min für die Dauer der Wirkung des DSS gewählt. Als Stopplösung wurde 3,3µl 1M Lysin-Monohydrochlorid verwendet, da wie sich anhand von Kontrollen herausstellte, 1M 1M Tris/HCl als ungeeignet erwies. Alternativ konnte auch 1M Glycin als Stopplösung verwendet werden, was aber aufgrund der Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht geschah. Nach einer fünfzehnminütigen

Einwirkdauer der Stopplösung wurden die Proben mit 11,3µl 4x Solubilisierungspuffer vermischt und für 10min auf 55°C erwärmt. Als Kontrolle diente zum einen rekombinantes Protein ohne DSS Cross-Linker, sowie ein Ansatz bei dem zuerst die Stopplösung Lysin-Monohydrochlorid und erst darauf der Cross-Linker DSS hinzugefügt wurden. Die weitere Auswertung geschah durch eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot, wobei pro Ansatz 20µl der vorbereiteten Probe verwendet wurden.

### **2.2.3.3 Experimente zur Modifikation von Proteinen**

#### **2.2.3.3.1 *In vitro* Phosphorylierung**

EBNA (293T) Zellen (10er Schale) wurden mit jeweils 2,5µg Plasmid-DNA transfiziert. Die DNA Konzentrationsbestimmung erfolgte dabei unmittelbar vor der Transfektion. Nach 36 Stunden wurden die Zellen in 1ml PBS<sub>complete</sub> geerntet, bei 3.500Upm (10min, 4°C; Heraeus Tischzentrifuge) angereichert und anschließend durch milde Ultraschallbehandlung (2x 15s, Stufe 40) mit einem Ultraschallstab (KONTES - micro ultrasonic disrupter, USA) aufgebrochen. Die Zelltrümmer und unlöslichen Bestandteile wurden durch eine abermalige zehnmünütige Zentrifugation, diesmal bei 12.000Upm (4°C; Heraeus Tischzentrifuge) entfernt, und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

2mg des in PBS befindlichen Proteins wurden mit 5µl 20%igem SDS (Endkonzentration 1%) und 1µl β-Mercaptoethanol bei einem Gesamtvolumen von 100µl für 10min bei 60°C reduziert und vollständig entfaltet. Anschließend wurden 15µl des reduzierten Proteins (~250µg) mit 3µl CIAP (1U/µl; Fermentas) vermengt und mit PBS<sub>complete</sub> auf ein Reaktionsvolumen von 100µl aufgefüllt. Eine Kontrolle enthielt jeweils keine alkalische Phosphatase, stattdessen nur reduziertes Protein in PBS.

Die 100µl Reaktionsvolumen der zuvor dephosphorylierten Proteinlösung wurden mit weiteren 150µl PBS<sub>complete</sub> aufgestockt und mit 7µl des monoklonalen Hämagglutin Antikörpers 3F10 (Konzentration: 100µg IgG/ml) von Roche über Nacht bei 4°C über Kopf schüttelnd inkubiert. Die Präzipitation erfolgte mit 60µl G-Sepharose (Perbio) über Kopf schüttelnd im Kühlraum bei 4°C. Nach einer Stunde wurde der Überstand abgenommen und bei -20°C aufbewahrt, und die Proben dreimal mit 1x Kinasepuffer [8mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM EGTA, 50mM Tris, 50mM Pipes pH 6.8] mit Proteaseinhibitorcocktail I+II (Sigma-Aldrich) gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift wurde der 1x Kinasepuffer vollständig entfernt

und der G-Sepharose 40µl 1,5x Kinasepuffer hinzugefügt. Die Rückphosphorylierung erfolgte durch Zugabe von 10µl  $\gamma$ -ATP-Gemisch (75mM ATP + 200µCi  $\gamma$ -ATP und 10µl Protein Kinase A (insgesamt 5U PKA; Sigma-Aldrich). Nach einer halbstündigen *in vitro* Phosphorylierung bei Raumtemperatur wurde die Rückphosphorylierung durch Zugabe von 4x Auftragspuffer beendet. Die Proben wurden 10min bei 55°C reduziert und anschließend über SDS-Gelelektrophorese weiter analysiert. Darauf folgte die Übertragung der nach Größe separierten Proteine auf eine PVDF-Membran (Western Blot). Die Membran wurde Ponceau S gefärbt. Anschließend wurde in Höhe der unterschiedlichen Proteinmarkerbanden ein Tropfen der präzipitierten radioaktiven Probe auf die Membran getupft, um die Markerbanden bei der Auswertung der radioaktiven Proben unterscheiden zu können. Für die Detektion wurde eine Imaging Plate (IP, Fuji Photo Film Co., Japan) über Nacht auf die radioaktiv markierte Membran aufgelegt. Die Auswertung der Imaging Plate geschah mittels Autoradiographie in einem Phospho-Imager (FLA 5000 Fuji) unter Verwendung spezieller Software (Aida, Imaging Software, Raytest).

#### **2.2.3.3.2 *In vitro* Deglykosylierung**

Nach erfolgter Membranpräparation von transient transfizierten COS-7 Zellen wurde in einem ersten Ansatz 800µg des Gesamtproteins in 50mM Phosphatpuffer pH 7,5 mit 10µl 10% SDS und 1µl  $\beta$ -Mercaptoethanol auf ein Reaktionsvolumen von 100µl eingestellt und für 10min bei 55°C denaturiert. 10µl dieses ersten Ansatzes wurden dann mit einem 1% NP-40 enthaltenen 50mM Phosphatpuffer pH 7,5 und 2µl (1Unit/µl) N-Glykosidase F Lösung der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) auf ein Reaktionsvolumen von ebenfalls 100µl aufgefüllt und über Nacht (~18h) bei 37°C in einem schüttelbaren Heizblock der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) inkubiert. 20µl des zweiten Ansatzes wurden mit 6,6µl 4x Auftragspuffer versetzt und für 10min auf 55°C erwärmt. Anschließend konnte die Probe auf ein achtprozentiges SDS-Gel aufgetragen, werden und daraufhin mit Hilfe der Western Blot Analyse ausgewertet werden.

## **2.2.3.4 Analytische Verfahren zur Charakterisierung von Proteinen**

### **2.2.3.4.1 Proteinbestimmung**

Die Bestimmung an Gesamtprotein erfolgte nach Bradford, 1976 und unter Verwendung einer Färbelösung der Firma Biorad (München, Deutschland). 10µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden in eine 96-Loch-Titerplatte gegeben, mit 200µl der Bradford-Lösung vermengt und für 15min leicht schüttelnd inkubiert. Dabei wurden für jede Probe zwei Verdünnungen  $x$  und  $\frac{1}{2}$  in Doppelansätzen gemessen, um die Aussagekraft zu erhöhen. Die Auswertung der Proteinkonzentration erfolgte in einem Mikrotiterplattenlesegerät der Firma Tecan (Crailsheim, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 595nm. Als Proteinstandard diente in demselben Puffer wie das zu bestimmende Protein gelöstes Rinderserumalbumin (BSA) Fraktion V (Merck, Deutschland) in den Konzentrationen 0,0625 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,250 mg/ml, 0,5 mg/ml und 2 mg/ml.

Die Proteinkonzentration Detergenz enthaltender Proteinlösungen wurde unter Verwendung des BCA Protein Assay Reagent Kits (Biorad, Deutschland) bestimmt. Die Auswertung erfolgte ebenfalls unter Verwendung von 96-Loch-Titerplatten und mit Hilfe des Tecan Mikrotiterplattenlesegeräts bei einer Wellenlänge von 650nm.

### **2.2.3.4.2 Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die Charakterisierung der gereinigten Proteine erfolgte durch eine SDS-Gelelektrophorese aufgrund der molekularbiologischen Größenunterschiede und dem unterschiedlichen Laufverhalten (Laemmli, 1970). Der Gellauf erfolgte in Mini-Protean Kammern der Firma Biorad (München, Deutschland). Die Proteinlösungen wurden mit 4x Auftragspuffer versetzt und für 10min bei 55°C erwärmt, um die Membranproteine zu entfalten.

Höhere Denaturierungstemperaturen erwiesen sich als eher ungünstig, da die zu untersuchenden Membranproteine anscheinend zu unlöslichen Aggregaten verschmolzen und nicht mehr aufgetrennt werden konnten. Eine geeignete Menge von Protein (15-50µg) wurde mit Hilfe des Glycerin enthaltenden, mit Bromphenolblau eingefärbten Auftragspuffers in die Taschen des Sammelgels gefüllt. Ein Gel mit zehn Taschen konnte bis zu einem Probenvolumen von maximal 35µl, ein Gel mit fünfzehn Taschen hingegen mit maximal 25µl beladen werden. In einem ersten Schritt wurden die Proteine zuerst für 15min bei 100V im

Sammelgel fokussiert. Sobald die Proteine in das Trenngel eingelaufen waren und die Markerbanden begannen sich nach ihrer Molmasse aufzutrennen, wurde die angelegte Spannung auf 160V erhöht. Mit dem Auslaufen der Lauffront aus dem Trenngel in den SDS-Laufpuffer wurde der Gellauf in der Regel gestoppt und das Gel konnte nun entweder Coomassie gefärbt, oder mittels Semi-Dry bzw. Tank-Blot auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran übertragen und durch geeignete Immunologische Verfahren (Western Blot) weiter charakterisiert werden.

#### **2.2.3.4.3 Konservierung von Polyacrylamidgelen**

Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgele wurden zur dauerhaften Dokumentation unter Verwendung spezieller Cellophanfolien (Biorad, USA) in Selbiger eingeschlagen und für 2 bis 4 Stunden bei Raumtemperatur oder für eineinhalb Stunden in einem Heizofen (Biorad, Deutschland) getrocknet. Die SDS-Gele wurden davor über Nacht bei 4°C in Wasser gespült, um eventuelle Reste an Methanol zu entfernen. Anschließend wurde eine Schicht Cellophanfolie auf einen Rahmen gespannt und auf diese das zu trockende SDS-Gel überführt. Unter Verwendung von H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> wurde die zweite Schicht an Cellophanfolie frei von Luftblasen auf das SDS-Gel gelegt und anschließend zusammen mit der ersten Schicht Cellophanfolie in den Rahmen gespannt und zum Trocknen aufgehängt.

#### **2.2.3.4.4 Western Blot Analyse**

Für weiterführende immunologische Untersuchungen wurden die mit Hilfe der Gel-Elektrophorese im SDS-Gel separierten Proteine als nächstes auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) übertragen. Dies geschah mittels der Semidry oder durch die Tank Blot-Methode.

Für die Semidry Blots wurden zunächst drei 9cm x 6cm große Stücke aus Spezialpapier der Firma Whatman (Maidstone, Großbritannien) zurechtgeschnitten und in Transferpuffer getaucht, bis diese vollgesogen waren. Anschließend wurde ein ebenfalls 9cm x 6cm großes Stück PVDF Membran frei von Luftblasen auf die feuchten Whatman Papierstücke gelegt. Wichtig war dabei, dass die PVDF Membran davor zuerst in Methanol äquilibriert werden musste, um flexibel und aufnahmebereit zu werden. Anschließend wurde die Membran für 5min in H<sub>2</sub>O<sub>Milliq</sub> gewaschen und zuletzt für weitere 10min in Transferpuffer überführt, bevor

die Übertragung auf das Whatman-Papier stattfinden konnte. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde, ebenfalls luftblasenfrei, direkt auf die äquilibrierte Membran gelegt. Den Abschluss bildete eine weitere Lage aus drei 9cm x 6cm großen Stücken aus Spezialpapier. Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte nach der Semidry Methode in einer Blot-Apparatur der Firma Biorad (München, Deutschland) für 110min bei einer Spannung von konstant 24V. Bei der Semidry-Methode sind lediglich die Lagen aus Spezialpapier mit Flüssigkeit getränkt im Gegensatz zur Nass Blot oder auch Tank Blot Verfahren genannten Methode zur Übertragung von Proteinen.

Bei dem sogenannten Tank Blot erfolgt die Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf die PVDF Membran mit Hilfe einer gänzlich mit Pufferlösung gefüllten Apparatur (Biorad, Deutschland) und durch das Anlegen einer konstanten Spannung von 20V über Nacht (~18 h). Die Schichtung und die Größe des verwendeten Spezialpapiers, sowie die Vorbereitung der PVDF Membran und des SDS-Gels entsprach dabei dem bereits zuvor beschriebenen Aufbau. Lediglich die verwendeten Transferpuffer für die beiden Übertragungsverfahren unterschieden sich in ihrer Zusammensetzung. Da es beim Tank Blot Verfahren aufgrund des konstanten Stroms zu einer starken Erwärmung der Pufferlösung kam, wurde die Übertragung daher insgesamt im Kühlraum bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Kurz vor Ende des Übertragungsvorgangs wurde der Strom zusätzlich für 30min auf einen Strom von 70V erhöht, um eine vollständige Übertragung der Proteine auf die PVDF Membran zu gewährleisten.

Für die weitere immunologische Auswertung der PVDF Membranen wurden diese zunächst für 15min mit einer 5%igen Milchpulverlösung (Roth, Deutschland) mit TBS-Tween (0,1%) blockiert. Für die Reaktion des ersten Antikörpers mit den Proteinen der Membran wurde dieser ebenfalls in der 5%igen Milchpulverlösung in einem Verhältnis von 1:200 bis 1:1000, je nach verwendetem Antikörper angesetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Membran mit dem jeweils benutzten Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBS-Tween (0,1%) gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper in einem Verhältnis von 1:5000 bis 1:10000 abermals für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Überschuss an sekundärem Antikörper wurde durch dreimaliges, fünfminütiges Waschen mit TBS-Tween (0,1%) entfernt. Die Auswertung erfolgte durch die Reaktion der an den sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase mit einer Chemilumineszenzlösung der Firma Amersham (Freiburg, Deutschland). Gut funktionierende Antikörper benötigten lediglich die Chemilumineszenzlösung ECL plus (Amersham, Deutschland), schwache Signale wurden unter Verwendung der

Advance Chemilumineszenzlösung der Firma Amersham verstärkt. Die Exposition erfolgte anhand der Chemilumineszenz registrierenden Geräte LAS-1000 oder LAS-3000 (Fuji-Film, Japan).

#### **2.2.3.4.5 Wiederverwendung von PVDF Membranen**

Nach erfolgter Western Blot-Analyse wurde dieselbe Membran oftmals mit einem zweiten Paar Antikörper untersucht. Um eventuelle Kreuzreaktionen mit den zuerst verwendeten Antikörpern zu vermeiden, wurden die ursprünglich an die auf den Proteinen der PVDF Membran gebundenen Antikörper entfernt. Dazu wurde die Membran als erstes durch einmaliges Waschen in TBST (0,1%) von überschüssiger Chemilumineszenzlösung befreit. Danach wurde die Membran noch einmal für 2min mit  $H_2O_{\text{Milliq}}$  gespült und anschließend mit  $\beta$ -Mercaptoethanol enthaltendem sogenannten „Stripping“ Puffer versehen und die Membran samt der Pufferlösung für 30min auf eine Temperatur von 70°C erwärmt. In regelmäßigen Abständen wurde dabei die Membran geschwenkt, um das Loslösen der Antikörper zu verstärken. Anschließend wurde der „Stripping“ Puffer verworfen und die Membran zuerst mehrmals mit  $H_2O_{\text{Milliq}}$ , und dann einmal mit TBST (0,1%) gespült. Zur Kontrolle wurde die Membran jetzt nochmals mit Chemilumineszenzlösung (Amersham, Schweden) behandelt und in das LAS-1000 bzw. LAS-3000 Gerät zur Auswertung der Chemilumineszenz gegeben. War kein erneutes Signal für die zuerst verwendeten Antikörper ersichtlich, so konnte die Membran jetzt nach einem kurzen Waschen mit TBST (0,1%) für eine erneute Western Blot-Analyse vorbereitet werden. Wenn aber noch Signal des ersten Antikörpers zu erkennen waren, so musste die Membran erneut mit „Stripping“ Puffer behandelt werden, wobei eine zu lange Einwirkzeit vermieden werden sollte, da auch die Proteine auf der Membran bei einer zu langen Einwirkdauer abgewaschen werden können.

#### **2.2.3.4.6 Quantifizierung der Oberflächenexpression von Proteinen**

Die Quantifizierung der Oberflächenexpression der zu untersuchenden Proteine in *Xenopus laevis* Oozyten erfolgte anhand von Hämagglutinin (HA) Epitop markierten Konstrukten. Als Negativkontrolle dienten Oozyten denen Konstrukte ohne HA-Epitop injiziert worden waren. Die Oozyten wurden ähnlich wie bei der Western Blot Methode als erstes für 30min in einer Blockierlösung aus ND96 mit 1%BSA bei 4°C inkubiert, anschließend erfolgte die Zugabe



des 1:200 verdünnten anti-HA Antikörpers 3F10 (Roche, Deutschland) für eine weitere Stunde. Weiterhin wurden die Oozyten dreimal für 10min bei 4°C mit ND96 gewaschen. Als nächstes erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem sekundären mit Meerrettichperoxidase gekoppelten Ziege anti Ratte Antikörper (Jackson ImmunoResearch, USA) mit einer Verdünnung von 1:500 in ND96 mit 1%BSA bei ebenfalls 4°C. Danach wurden die Oozyten insgesamt viermal mit ND96 gewaschen und in 50µl SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate Lösung (Pierce, Rockford, IL) aufgenommen. Die Auswertung der relativen Lichteinheiten erfolgte in einem Luminometer des Typs TD-20/20 (TURNER, Sunnyvale, USA).

### **2.2.3.5 Nachweis von Proteinen**

#### **2.2.3.5.1 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen**

Das Färben von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Färbelösung dient der Kenntlichmachung von Proteinen, die nach dem vollendeten Gellauf in der Matrix des Gels entsprechend ihrer Größe aufgetrennt vorliegen.

Nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese wurden die SDS-Polyacrylamidgele direkt in verschließbare Plastikboxen überführt und kurz mit H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> gespült. Anschließend wurde das Gel mit der Färbelösung gänzlich bedeckt und für zwei Stunden oder auch über Nacht bei Raumtemperatur leicht schüttelnd inkubiert. Nach der erfolgten Färbung des Gels wurde überschüssige Färbelösung durch mehrmaliges Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> entfernt. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Gels unter Verwendung des Entfärbers für ungefähr ein bis zwei Stunden. Dabei war zu beachten, dass ein zu lange andauerndes Entfärben ebenfalls mit der Entfärbung der im Gel enthaltenen Proteine einhergeht. Als ein Maß für die Unterscheidung der angefärbten Proteine diente ein ebenfalls ungefärbter Größenstandard der Firma Biorad.

#### **2.2.3.5.2 Ponceau-Färbung von PVDF Membranen**

Als Beweis für die erfolgreich durchgeführte Übertragung von Proteinen aus dem SDS-Polyacrylamidgel, dem sogenannten Western Blot, und dessen gleichmäßige Beladung mit Proteinen wurden die Polyvinylidenfluorid Membranen (PVDF-Membranen) mit Hilfe einer

Ponceau S-Lösung (Roth, Deutschland) rot angefärbt. Zusätzlich zu dem Färben werden die Proteine dabei angeblich stärker an der Membran fixiert. Nach dem „Blotten“ der Membranen wurden diese zuerst in verschließbare Plastikboxen überführt und mehrmals mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$  gewaschen, um eventuelle Reste an Puffer zu entfernen. Danach wurde die Membran vollständig mit der Ponceau S-Lösung bedeckt und für zehn Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die verwendete Färbelösung entfernt und konnte lichtgeschützt für weitere Färbungen aufbewahrt werden. Die gefärbte Membran wurde erneut mehrmals mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$  gewaschen, bis nur noch die mit Protein behafteten Bereiche angefärbt waren. Zur Dokumentation kann die Ponceau S gefärbte Membran auch zwischen zwei Overheadfolien fixiert, mit Hilfe von Digitalkameras oder auch Kopierern protokolliert werden, ohne dass die Membran austrocknet. Eine anschließende Behandlung mit Antikörpern ist dann ebenfalls noch möglich.

## **2.2.4 Immunologische Methoden**

### **2.2.4.1 Gewinnung von Antikörpern**

#### **2.2.4.1.1 Reinigung von Seren**

Für die Produktion von polyklonalen Antikörpern wurden als erstes zwei Peptide für die  $\alpha$ -Untereinheit von KCNQ2, der Einfachheit halber als 391.1 und 392.1 bezeichnet, und zwei Peptide für die  $\alpha$ -Untereinheit von KCNQ3, 393.1 und 394.1 synthetisiert (Davids, Regensburg, Deutschland). Diese wurden vier unterschiedlichen Kaninchen, mit den Nummern 5297 und 5298 für KCNQ2 Antiseren und 5299 sowie 5300 für KCNQ3 Antiseren injiziert, damit diese polyklonale Antikörper gegen die jeweiligen Peptide bilden. Weiterhin wurden diesen Kaninchen Seren zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommen, um die Produktion der Antikörper zu kontrollieren. Eine Probe vor der Injektion der Peptide diente als Negativkontrolle und nach der Injektion drei weitere Proben als Positivkontrolle, die auch als 1., 2. und 3. Blutung bezeichnet wurden. Die mehrere Wochen nach der Injektion der Peptide entnommene 3. Blutung diente zur Herstellung der polyklonalen Seren. Die Affinitätsreinigung der Seren erfolgte unter Verwendung des Sulfo Link Coupling Gel der Firma Pierce Biotechnology (zu Perbio dazugehörig, Rockford, USA) und nach deren Protokoll.

Vier Säulen wurden mit 800µl des Sulfo Link Coupling Gels befüllt und anschließend mit 6ml Bindepuffer [50mM Tris-HCl, 5mM EDTA pH 8,5] äquilibriert. 1mg der jeweiligen Peptide wurde in 250µl Bindepuffer gelöst über die Säule gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Säulen mit 3ml Bindepuffer gewaschen. Zur Blockade von unspezifischen Bindungen wurde 1ml Blockierlösung [50mM 2-Cystein-HCl in Bindepuffer gelöst] auf die Säulen aufgetragen. Die Säulen wurden jeweils erst mit 6ml 1M NaCl, darauf zweimal mit jeweils 2ml PBS mit 0,05% Natriumazid gewaschen und über Nacht verschlossen bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Säulen mit 10ml des Natriumazid enthaltenden PBS gewaschen. Die Aufreinigung der Seren erfolgte durch Zugabe eines 1:1 Gemisches bestehend aus den jeweiligen Seren mit demselben Volumen an Natriumazid enthaltendem PBS. Es wurden insgesamt 2ml dieser Mischung verwendet. Die Säulen mit dem dazugehörigen Serum wurden drei Stunden über Kopf schüttelnd inkubiert. Daraufhin wurden die Säulen zuerst mit 20ml 1x PBS und dann einmal mit 10x verdünntem PBS gewaschen. Die Elution erfolgte durch Zugabe von zehn Einheiten an 200µl Glycin-Puffer [100mM Glycin pH 2,5 bis 3,0]. Eine Auswertung der Fraktionen über die Effektivität der gereinigten polyklonalen Antikörper erfolgte anhand von transient mit KCNQ2 oder KCNQ3 transfizierten COS-7 Zellen.

### **2.2.5 Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.5.1 Verwendung von eukaryotischen Zellkulturen**

##### **2.2.5.1.1 Kultivierung von Zellkulturen**

Die Kultivierung eukaryotischer Zelllinien, wie die COS-7 Zellen der afrikanischen Grünen Meerkatze *Cercopithecus aethops*, oder die humanen embryonalen Nierenzellen HEK-293 erfolgte bei einer Temperatur von 37°C und bei gleichzeitiger Begasung mit 5% Kohlendioxid in einem Brutschrank (Hettich, Deutschland) in Petrischalen (Sarstedt, Deutschland) unterschiedlicher Größe.

##### **2.2.5.1.2 Passagieren von Zellkulturen**

Als Garantie für ein konfluentes Wachstum eukaryotischer Zelllinien wurden diese in regelmäßigen Abständen passagiert und gleichmäßig auf neue 10cm Petrischalen (Sarstedt, USA)

verteilt. Zuerst wurde das alte DMEM High Glucose Kulturmedium (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) entfernt und die meist adhärenz vorliegenden Zellen einmal mit 5ml PBS gewaschen. Anschließend wurde das PBS entfernt und die Zellen mit 1ml eines Trypsin/EDTA Gemisches (GIBCO BRL, Deutschland) für etwa 5min bei Raumtemperatur behandelt, bis sich die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden der Petrischale lösten. Die abgelösten Zellen wurden nun durch Zugabe einer geeigneten Menge an frischem DMEM verdünnt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren zu einzelnen, frei beweglichen Zellen separiert und zusammen mit frischem DMEM in neue Petrischalen überführt. Das frische DMEM High Glucose Kulturmedium wurde zuvor durch Zugabe von 10% fötalem Kälberserum (PAA, Cölbe, Deutschland) und 5ml einer Penicillin/Streptomycin Lösung [100µg/ml] angereichert. Die 10cm Petrischalen wurden mit maximal 10ml DMEM Kulturmedium befüllt. Das Wachstum erfolgte wie für eukaryotische Zellen üblich, bei 37°C bei gleichzeitiger Begasung mit 5% CO<sub>2</sub> in einem geeigneten Brutschrank (Heraeus, Deutschland).

### **2.2.5.1.3 Transiente Transfektion von Zellkulturen**

Die Transfektion bezeichnet die Aufnahme von DNA durch eukaryotische Zellen. Die Aufnahme der DNA wurde dabei durch die Verwendung von Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Germany) und FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Deutschland) gesteigert.

Die verwendeten Zelllinien wurden in 10cm Kulturschalen (Sarstedt, Deutschland) überführt. Nach dem Passagieren wurden sie über Nacht in einem Brutschrank (Heraeus, Deutschland) bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, um sicher zu stellen, dass die Zellen konfluent auf dem Plattenboden verteilt vorlagen. Am nächsten Tag wurde das verwendete Medium entfernt und die Zellen mit 5ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit neuem Medium versorgt.

Für den eigentlichen Transfektionsansatz wurden 300µl serumfreies Medium in einem 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Deutschland) mit 2,5µg Plasmid-DNA vermengt und anschließend mit 7,5µl der Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 oder FuGENE 6 versehen. Der gesamte Ansatz wurde von Hand geschüttelt und daraufhin abzentrifugiert. Nach einer halbstündigen Inkubation wurde der Transfektionsansatz gleichmäßig auf die Kulturschalen verteilt. Diese wurden wiederum für zwei bis drei Tage bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### **2.2.5.1.4 Kontrolle auf Mykoplasmen**

In regelmäßigen Abständen wurden die in Kultur befindlichen eukaryotischen Zelllinien durch lichtmikroskopische Untersuchungen auf Verunreinigungen durch beispielsweise Hefen untersucht. Ein Befall von Mykoplasmen kann nur durch zusätzliche Färbemethoden, wie Färbungen mit DAPI erfolgen. Eine schnelle und überaus genaue Alternative für die Erkennung von Infektionen mit Mykoplasmen bietet die „Nested“ PCR. Dabei wurde anhand spezifischer Primer bei einer erfolgten Infektion ein Fragment mit einer Größe von ungefähr 500 Nukleotiden erzeugt. In einer zweiten PCR wurde dann das Signal aus der ersten PCR durch das Binden zweier weiterer Primer innerhalb des ersten PCR Produktes zusätzlich verstärkt. Dabei entstand ein ungefähr 350 Nukleotide großes PCR Fragment.

Nach einem zweitägigen Wachstum wurden 200µl des Kulturmediums entnommen und für 5min auf 95°C erwärmt, anschließend wurde die Probe eine Minute bei 4.000Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. 1µl des Überstands wurde für Testzwecke entnommen und als Matrize für die erste PCR verwendet, von der wiederum 1µl als Matrize für die zweite PCR diente. Als Positivkontrolle diente der Überstand aus dem Kulturmedium kontaminierter Zellkulturen, als Negativkontrolle diente ein PCR Ansatz ohne Kulturmedium mit lediglich 1µl H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub>.

#### **2.2.5.1.5 Konservierung von Zellkulturen**

Das Konservieren eukaryotischer Zelllinien über einen längeren Zeitraum erfolgte durch Einfrieren bei -80° oder in flüssigem Stickstoff. Zuerst wurden die konfluent gewachsenen Zellen in 5ml PBS gewaschen und anschließend in 1ml DMEM Kulturmedium (siehe 2.1.9) aufgenommen. Durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 600g in einer Universal-Zellzentrifuge (Hettich, Deutschland) wurden die Zellen sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1ml DMEM Kulturmedium mit 20% DMSO (Roth, Deutschland) zuerst langsam auf Trockeneis, dann über Nacht bei -80°C eingefroren. Anschließend konnten die Proben für eine längere Lagerung auch in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Das Auftauen der eingefrorenen Zellen erfolgte bei Raumtemperatur. Nach dem Auftauen wurden die in Einfriermedium (DMEM Kulturmedium mit 20%DMSO) gelösten Zellen in 15ml Sarstedt Reaktionsgefäße überführt und durch fünfminütiges zentrifugieren bei 600g in der Universal-Zellzentrifuge (Hettich, Deutschland) sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in 10ml DMEM Kulturmedium aufgenommen und in 10cm Kulturschalen überführt.

## 2.2.6 Elektrophysiologische Methoden

### 2.2.6.1 Verwendung von *Xenopus laevis* Oozyten

#### 2.2.6.1.1 Präparation von *Xenopus laevis* Oozyten

Für physiologische Untersuchungen zur Funktionsweise der spannungsabhängigen Kaliumkanäle von der Art der KCNQs wurden Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* nach H. Lerche et al. (1999) präpariert. Die im Durchschnitt etwas über 1mm im Durchmesser großen Oozyten zeichnen sich durch einen um ein vielfaches größeren Anteil an Cytoplasma im Vergleich zur menschlichen Eizelle aus. Die Oozyte besteht aus einem dunkel gefärbten animalen Pol und dem deutlich helleren vegetativen Pol. Aufgrund der Größe stellt die Oozyte einen idealen Modellmechanismus zur Untersuchung der Funktionsweise von Kanalproteinen dar. mRNAs können leicht durch Mikroinjektionen in das Innere des Froscheis eingebracht und durch das Vorhandensein einer vollständigen Transkriptions- und Translationsmaschinerie sozusagen *in vivo* synthetisiert werden, um letztendlich als Bestandteil innerhalb der Zellmembran vorzuliegen.

Für die Präparation der Oozyten wurde ein *Xenopus* Weibchen durch das Narkotikum Tricaine (Sigma-Aldrich, Deutschland) betäubt. Zu diesem Zweck wird der Frosch in einen Behälter überführt, der zuvor mit einer 4°C kalten 0,23%igen Tricaine Lösung gefüllt wurde. Nach einer viertelstündigen Inkubation war der Frosch narkotisiert. Als sicheres Anzeichen der Betäubung drehte man den Frosch kurzzeitig auf den Rücken. Erfolgte keine Gegenwehr, so war die Narkose erfolgreich. Für die eigentliche Präparation wurde der Krallenfrosch rücklings auf ein Operationstuch gebettet. Unter diesem befand sich eine mit Eis gefüllte Schale, um die Stoffwechselfunktion auf ein Minimum einzuschränken.

Durch einen halben Zentimeter langen Schnitt im Unterleib des Frosches wurde sowohl die obere Hautschicht als auch die Bauchdecke des Krallenfrosches durchtrennt, wie in Abbildung 2.2(A) gezeigt. Unter Zuhilfenahme einer Pinzette wurde ein ca. 5cm langer Abschnitt des Dottersacks freigelegt und mit einer Schere durchtrennt. Der Dottersack wurde aufgeschnitten und die Oozyten durch ein dreistündiges Einwirken in Kollagenaselösung (Roche, Deutschland) mit einer Konzentration von 2mg/ml einzeln freigelegt. Anschließend wurde die Kollagenaselösung durch mehrmaliges Waschen mit ND96 Puffer entfernt. Für eine bessere Weiterverarbeitung wurden die Oozyten nach dem Reifegrad sortiert. Nur die

Reifen vollständig in animalen und vegetativen Pol differenzierten Oozyten wurden bis zur Injektion bei 17°C separat gelagert, wie in Abbildung 2.2(C) gezeigt wird.

Die Wunde des Krallenfrosches wurde unter sterilen Bedingungen vernäht und dieser über Nacht in ein Aufwachbecken überführt, um sicherzustellen, dass er nicht durch eventuelle Nachschlafphasen ertrinkt. Der Rücken des Frosches wurde mit nassen Tüchern bedeckt und dieser durch einen Zulauf an frischem lauwarmem Wasser aus der Narkose aufgeweckt. Die Abbildung 2.2(B) zeigt einen narkotisierten Krallenfrosch in einem Aufwachbecken nach beendeter Operation. Auch nach der Aufwachphase wurde der Frosch getrennt von den anderen Fröschen gehalten, um Infektionen zu vermeiden. Erst am darauffolgenden Tag wurde er zu den übrigen Krallenfröschen zurückgebracht. Eine erneute Oozytenpräparation erfolgte in Abständen von zwei bis drei Monaten damit der Frosch jeweils vollständig regeneriert war.

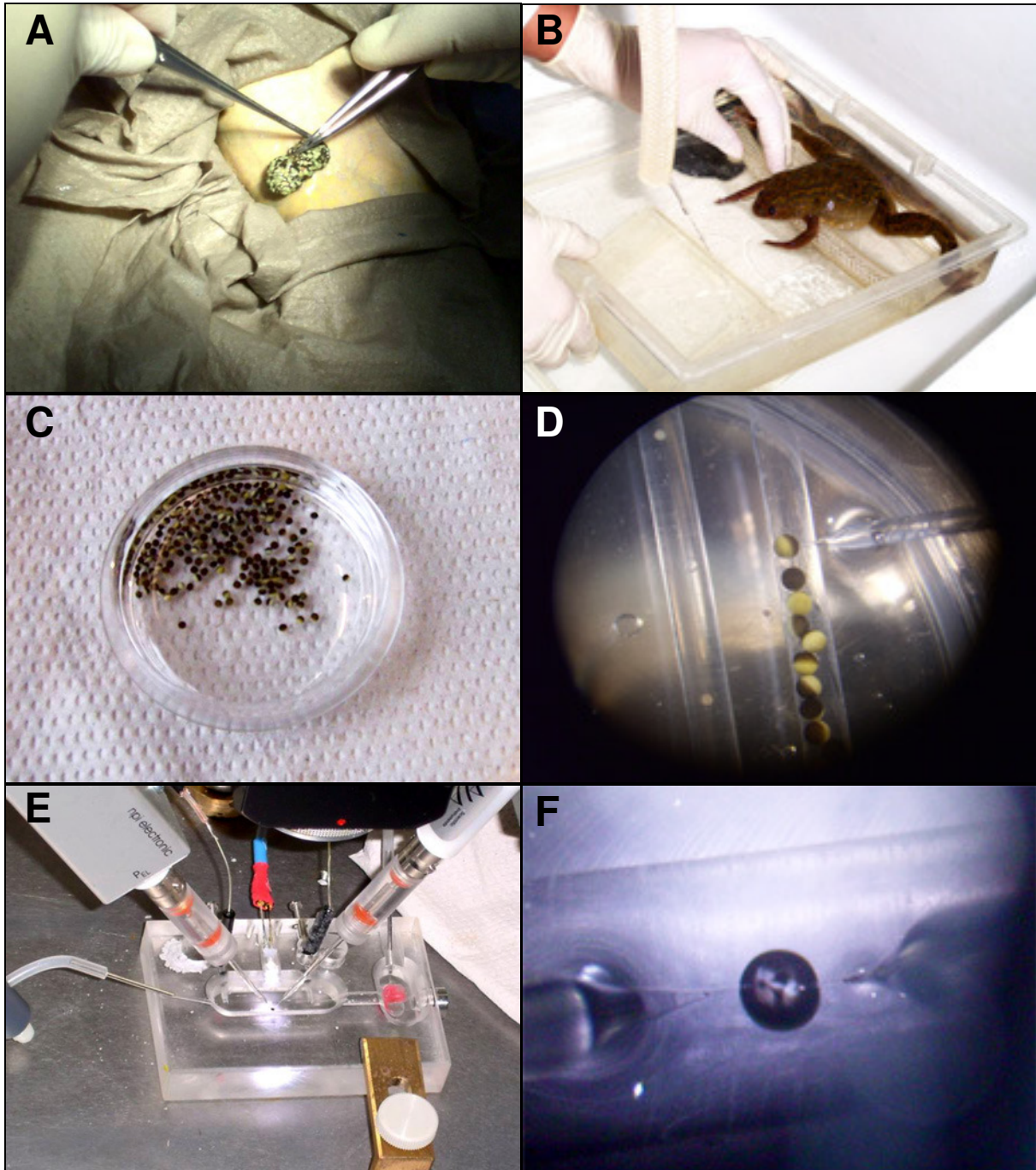
### **2.2.6.1.2 Injektion von RNA in *Xenopus laevis* Oozyten**

Für die Injektion der mRNA in die *Xenopus laevis* Oozyten wurden Glaspipetten (Drummond scientific, USA) mit Hilfe eines Horizontal-Pipettenziehgerätes (DMZ-Universal-Puller; Zeitz-Instrumente, Augsburg) gezogen, mit Silikonöl DC200 (Sigma-Aldrich) gefüllt und in ein WPI Nanoliter 2000 Mikropipetten-Injektionsgerät (World Precision Instruments, Sarasota, USA) eingespannt. Die Glaspipetten wurden luftblasenfrei mit 2µl bis 3µl mRNA [200ng/µl] befüllt. Anschließend wurden die einzelnen *Xenopus* Oozyten bei gleichzeitiger Beobachtung durch ein Stereomikroskop (Zeiss, Deutschland) mittels Mikroinjektion mit 50µl [~10ng] mRNA versehen und darauf die präparierten Oozyten für drei bis fünf Tage bei 17°C in einem Brutschrank gelagert. Abbildung 2.1(D) zeigt die Mikroinjektion von cRNA in eine *Xenopus* Oozyte. Erst nach mindestens drei Tagen war genügend Protein vorhanden, um eine Messung mit Hilfe eines Zwei-Elektroden-Messgerätes durchzuführen.

### **2.2.6.2 Auswertung elektrophysiologischer Experimente**

#### **2.2.6.2.1 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode**

Die Auswertung der physiologischen Messungen anhand von mit mRNA injizierter *Xenopus laevis* Oozyten geschah durch die Zwei-Elektroden- Spannungsklemmen-Methode (englisch,



**Abb. 2.2 Elektrophysiologische Untersuchungen an *Xenopus laevis* Oozyten.** Fotos: Ch. Beimgraben (A): Entnahme der *Xenopus* Oozyten. Durch einen kleinen Schnitt auf der Unterseite des Frosches können die Oozyten aus dem Inneren des Bauches entnommen werden. Die Oozyten sind noch durch einen Dottersack miteinander verbunden. (B): In einem Aufwachbecken wird der Krallenfrosch nach der Operation solange aufbewahrt, bis die Narkose vollständig abgeklungen ist. (C): Die Oozyten werden nach erfolgter Präparation aus dem Verband des Dottersacks herausgelöst und liegen einzeln vor. Dies geschieht durch einen Verdau mit Kollagenase-A Lösung [2mg/ml]. Anschließend werden die separierten Oozyten mehrmals mit ND96 Puffer gewaschen und in sterilen Petrischalen aufbewahrt. (D): Die Oozyten werden nach erfolgter Präparation durch Mikroinjektion mit 50nl an mRNAs [200ng/μl] für die Messungen vorbereitet. Dafür werden die Oozyten in Petrischalen mit eigens geschliffenen Glaseinsätzen überführt. Die Oozyten liegen dort in Rinnen arretiert und rutschen bei der Mikroinjektion nicht hin und her. (E): Nach einer zwei- bis fünftägigen Inkubation werden die in der äußeren Membran der *Xenopus* Oozyten gebildeten Kaliumkanäle mit Hilfe der Zwei-Elektroden Spannungsmessung untersucht. Links befindet sich die Potentialelektrode, rechts die dazugehörige Stromelektrode. In der Mitte, dem sogenannten Bad, befindet sich die Oozyte. (F): Aufnahme durch ein Binokular mit Aufsicht auf eine einzelne Oozyte. Die Spannungs- und die Stromelektrode werden für die Messung in die Oozyte hineingestoichen. Während der Messung befindet sich die Oozyte im sogenannten Bad und wird von einem Strom an ND96 Pufferlösung umspült.



*Two-Electrode-Voltage-Clamp-Method*, kurz TEVC-Methode) nach Strüher, 1992. Nach einer zwei- bis fünftägigen Inkubation waren genügend Kanäle für die Messung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle synthetisiert. Die Oozyten wurden in ein sogenanntes Bad überführt. Das Bad hatte eine Vertiefung für die Oozyte und einen Zu- und Ablauf für einen Durchfluss an ND96, so dass sich die Oozyte in einem ständigen Strom an Pufferlösung befand. Das hatte den Vorteil, dass an Stelle der normalen Pufferlösung auch solche mit Pharmazeutika, wie R-L3 in unterschiedlicher Konzentration eingesetzt und anschließend auch wieder ausgespült werden konnten. Bei der eigentlichen Messung wurden zwei Glaselektroden vorsichtig unter Zuhilfenahme eines Binokulars (Zeiss, Jena, Deutschland) in die Oozyte hineingestochen, wie in Abbildung 2.2(F) dargestellt wird. Die mit 3M KCl gefüllten Borosilikat Glaselektroden (Clarke Electromedical Instruments, Reading, GB) wurden mit Hilfe eines Horizontal-Pipettenziehgerätes (DMZ-Universal-Puller; Zeitz-Instrumente, Augsburg) gezogen und besaßen je nach entstandener Öffnung einen Widerstand von  $0,5\text{M}\Omega$  bis  $1,5\text{M}\Omega$ . Ihre Einteilung erfolgte in eine Potential- und eine Stromelektrode. Über die Potentialelektrode wird die angelegte Spannung gemessen, wohingegen mit der Stromelektrode der für die Aufrechterhaltung der angelegten Spannung notwendige Strom geliefert wird. Dadurch kann die Oozyte auf jede beliebige Spannung „geklemmt“ werden. Das Haltepotential während der Messungen betrug  $-80\text{mV}$ . Die Abbildung 2.2(E) gibt einen Überblick über das Bad mit einer darin befindlichen injizierten *Xenopus* Oozyte, die gerade mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode untersucht wird.

Mit Hilfe von zwei 1M KCl enthaltender Agarbrücken war das Bad mit einem Verstärker verbunden, wodurch ein Abgleich der vier Elektroden untereinander möglich war, so dass der Stromfluss gleich Null war. Erst durch das „Klemmen“ der Oozyte auf verschiedene Spannungen, angefangen von  $-80\text{mV}$  bis zu einer Spannung von  $+40\text{mV}$ , kam es durch ein verstärktes Öffnen der spannungsabhängigen Kaliumkanäle zu sich verändernden Strömen, die unter Verwendung eines TurboTec 05x npi Verstärkers (npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland) registriert werden konnten. Die resultierenden Ströme des Verstärkers wurden mit Hilfe des Digidata 1322A (Axon Instruments, USA) Umwandlers in Digitale Signale konvertiert und mit Hilfe der pCLAMP 9.2 Software auf einem IBM kompatiblen PC ausgewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der untereinheitenspezifischen Wechselwirkungsdomäne (si-Domäne) von spannungsabhängigen KCNQ Kanälen

##### 3.1.1 Untersuchungen über die Funktion der si-Domäne von KCNQ3 anhand von Deletionsmutanten

Von den derzeit fünf bekannten KCNQ  $\alpha$ -Untereinheiten ist KCNQ1 die einzige, die nicht in der Lage ist mit den weiteren Untereinheiten KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 und KCNQ5 heterotetramere Kanäle zu bilden. KCNQ3 beispielsweise kann mit den weiteren  $\alpha$ -Untereinheiten KCNQ2, KCNQ4 und KCNQ5 heterotetramere Kanäle erzeugen (Jentsch et al., 2000). Untersuchungen zur Assemblierung der KCNQ Kanäle ergaben, dass ein ungefähr 106 (K535 bis L620) Aminosäuren großer Bereich im C-Terminus sowohl für die Homotetramerisierung als auch für die Heterotetramerisierung der KCNQ Kanäle notwendig ist (Schmitt et al., 2000; Schwake et al., 2000; Schwake et al., 2003). Dieser Bereich wird auch als *subunit interaction domain* (si-Domäne) bezeichnet (Schwake et al., 2003).

Eine Koinjektion von KCNQ2 mit KCNQ3 in *Xenopus laevis* Oozyten führte zu bis zu zehnfach erhöhten Strömen im Vergleich zum homotetrameren Kanal von KCNQ2 und bis zu fünfzigfach erhöhten Strömen im Vergleich zum homotetrameren Kanal von KCNQ3 (Wang et al., 1998; Maljevic et al., 2003; Schwake et al., 2003).

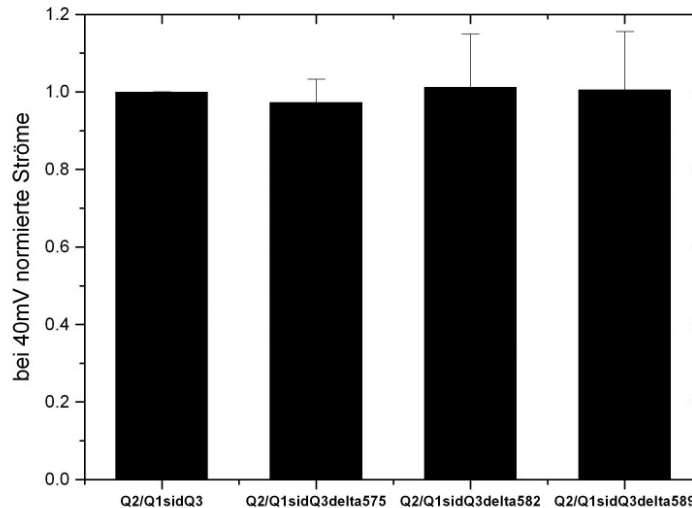
Ein Austausch der si-Domäne von KCNQ1 (Aminosäure 530 bis 620) gegen die si-Domäne von KCNQ3 (Aminosäure 535 bis 650), befähigte den neu entstandenen chimären Kanal von KCNQ1, Q1sidQ3, ebenfalls zu einer positiven Interaktion mit der weiteren  $\alpha$ -Untereinheit KCNQ2 in mit cRNA von Q1sidQ3 und KCNQ2 injizierten *Xenopus laevis* Oozyten (Schwake et al., 2003). Der resultierende Strom von Q1sidQ3, zusammen mit KCNQ2, entsprach in seiner Amplitude dem Strom des heterotetrameren Kanals von KCNQ2 mit KCNQ3. Die Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über den Bereich der beiden si-Domänen von KCNQ1 und KCNQ3.

Sequenzvergleiche der Aminosäureabfolge für die beiden si-Domänen der unterschiedlichen KCNQ Kanäle KCNQ1 und KCNQ3 ergaben eine weitgehende Übereinstimmung für den Bereich der si-Domäne. Lediglich die si-Domäne von KCNQ3 unterscheidet sich geringfügig



**Abbildung 3.1: Schematische Übersicht über die untereinheitenspezifischen Wechselwirkungsdomäne (si-Domäne) von KCNQ1 und KCNQ3.** Der chimäre *KCNQ* Kanal Q1sidQ3 (Schwake et al., 2003) besteht aus dem Proteinerückgrat von KCNQ1 mit der si-Domäne von KCNQ3. Zur besseren Übersicht wurden die si-Domänen von KCNQ1 und KCNQ3 fett gedruckt. Die an dem chimären *KCNQ* Kanal Q1sidQ3 untersuchten Punktmutationen L533W, K544W, R555C, I566F, S587M, M589D, K591H und K594Q sind durch Unterstreichen angedeutet. Des Weiteren sind die Bereiche für die untersuchten und deletierten Aminosäureabfolgen Q1sidQ3delta589, Q1sidQ3delta582 und Q1sidQ3delta575 der si-Domäne von Q1sidQ3 durch beschriftete Balken unter der aufgeführten Aminosäuresequenz für KCNQ3 betont.

in ihrer Länge von den übrigen vier *KCNQ* Kanälen und ist insgesamt um 25 Aminosäuren größer als die si-Domäne der übrigen vier *KCNQ* Kanäle (Schwake et al., 2003). Weiterhin zeigt der Sequenzvergleich der si-Domänen von KCNQ3 und KCNQ1 für KCNQ3 von Position Q586 bis einschließlich T610 keine entsprechenden Aminosäuren für KCNQ1. Da KCNQ1 nur mit sich selbst oder den KCNE-Untereinheiten funktionsfähige Kanäle produziert, wurde daher vermutet, dass die zusätzlichen 25 Aminosäuren für die si-Domäne von KCNQ3 eine Rolle bei der Heteromerisierung mit KCNQ2 ausmachen könnten. Zudem ist keine Mutation für diesen Bereich von KCNQ3 beschrieben. Es könnte daher sein, dass Mutationen für diesen Bereich von KCNQ3 zu gravierenden Veränderungen und zu einem Funktionsverlust für diesen neuronalen Kaliumkanal führt. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden insgesamt drei durch Deletion veränderte Kanäle von Q1sidQ3 mittels Fusions PCR (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.2.2.2.3) hergestellt und zusammen mit KCNQ2 in *Xenopus* Oozyten injiziert. Die Abbildung. 3.1 gibt einen Überblick über die drei chimären Kanäle Q1sidQ3delta589, Q1sidQ3delta582 und Q1sidQ3delta575 mit dem Proteinerückgrat von KCNQ1 und den entfernten Bereichen innerhalb der si-Domäne von KCNQ3. Eine

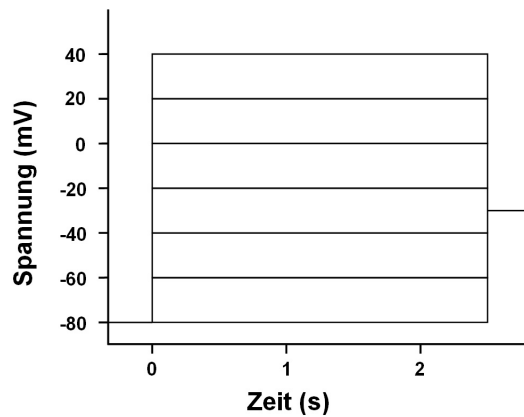


**Abbildung 3.2: Untersuchung über die Funktion der um 25 Aminosäuren verlängerten si-Domäne von KCNQ3 auf die heteromere Assemblierung mit KCNQ2.** Untersucht wurden die Ströme für die im Bereich der si-Domäne von Q1sidQ3 deletierten KCNQ Kanäle Q1sidQ3delta589, Q1sidQ3delta582 und Q1sidQ3delta575 bei gleichzeitiger Injektion von KCNQ2 in *Xenopus* Oozyten. Die Ergebnisse der bei 40mV gemessenen Ströme für Q1sidQ3delta589, Q1sidQ3delta582 und Q1sidQ3delta575 wurden anhand des heteromeren Kanals, bestehend aus Q1sidQ3 und KCNQ2, normiert und in Form eines Balkendiagramms dargestellt.

Koinjektion der drei beschriebenen Deletionsmutanten zusammen mit KCNQ2 führte zu keinen unterscheidbaren Strömen im Vergleich zu den mit Q1sidQ3 zusammen mit KCNQ2 injizierten *Xenopus* Oozyten. Die Abbildung 3.2 zeigt die bei einer Spannung von 40mV für den heteromeren Kanal von Q1sidQ3 mit KCNQ2 normierten Ströme der drei chimären Kanäle Q1sidQ3delta589, Q1sidQ3delta582 und Q1sidQ3delta575 zusammen mit KCNQ2. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die für den Bereich der si-Domäne von KCNQ3 vorkommenden zusätzlichen 25 Aminosäuren nicht für die Heteromerisierung von KCNQ2 und KCNQ3 verantwortlich sind. Daher wurde angenommen, dass die in Zusammenhang mit der si-Domäne von KCNQ3 vermittelte Assemblierung von KCNQ2 mit KCNQ3 durch weitere Effekte verursacht, und möglicherweise durch die Ausbildung bestimmter dreidimensionaler Strukturen oder zusätzlicher Domänen im Bereich der si-Domäne begünstigt wird.

### 3.1.2 Untersuchungen zur Assemblierung von KCNQ2 und KCNQ3 anhand von durch Punktmutation veränderten KCNQ Kanälen

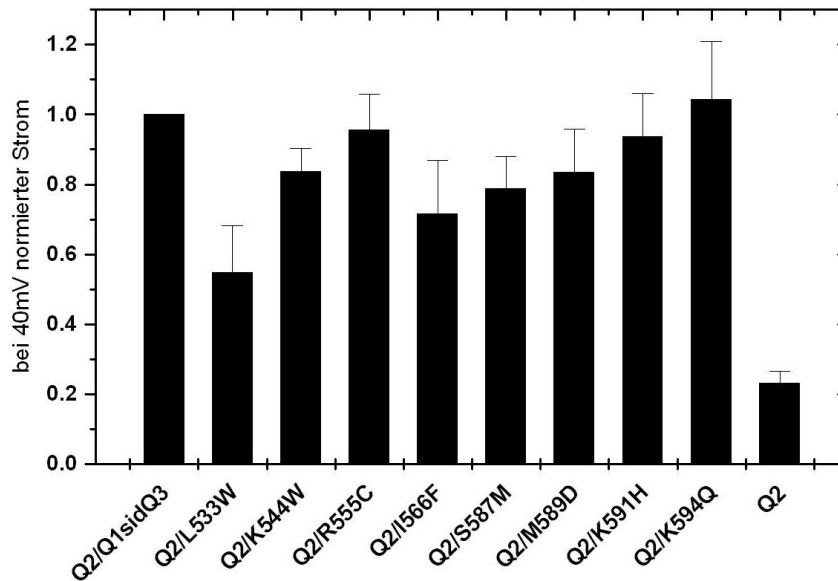
Mutationen des heteromeren Kanals bestehend aus den beiden Untereinheiten KCNQ2 und KCNQ3 treten in Form einer autosomal dominanten Art von Neugeborenenepilepsie, der *Benign familial neonatal convulsions* (BFNC) in Erscheinung. Dabei stehen die meisten



**Abbildung 3.3: Spannungsprotokoll für die Experimente mit injizierten *Xenopus laevis* Oozyten.** Die mit cRNA injizierten Oozyten wurden bei einem Potential von -80mV gehalten und anschließend in 20mV Schritten bis auf eine maximale Spannung von +40mV erhöht. Anschließend wurden die injizierten Oozyten für 250ms bei einer Spannung von -30mV gehalten und dann wieder auf ein Haltepotential von -80mV eingestellt.

bekanntes Mutationen in Zusammenhang mit KCNQ2. Insgesamt nur vier Mutationen sind für KCNQ3 beschrieben, die in Zusammenhang mit Neugeborenenepilepsie (BFNC) stehen, beispielsweise die beiden Punktmutationen D305G oder W309G im Bereich der Porenregion von KCNQ3, die zu einer Abnahme des gemessenen Stroms für den heterotetrameren Kanal mit KCNQ2 führen (Hirose et al., 2000; Singh et al., 2003; Bassi et al., 2005). Für den Bereich der si-Domäne von KCNQ3 ist derzeit noch keine Mutation im Zusammenhang mit BFNC beschrieben.

In einem ersten Ansatz sollten daher durch einen gezielten Austausch von Aminosäuren im Bereich der si-Domäne von Q1sidQ3 Erkenntnisse über die Assemblierung von KCNQ2 mit KCNQ3 gewonnen werden. Da, wie bereits erwähnt, nur einige wenige Mutationen für KCNQ3 beschrieben sind, erfolgte die Wahl der Punktmutationen anhand der für den Bereich der si-Domäne von KCNQ1 bekannten Veränderungen, die sich in Form des sogenannten *Romano-Ward Syndroms* (RWS), einer autosomal dominanten Erkrankung des Herzens äußern. Durch die Punktmutationen an den Positionen L533W (Chouabe et al., 2000), I566F (Splawski et al., 2000), sowie den weiteren Punktmutationen K544W (Neyroud et al., 1997) und R555C (Donger et al., 1997) S587M (Itoh et al., 1998), M589D (Piippo et al., 2001), K591H (Neyroud et al., 1999) und K594Q (Splawski et al., 2000), die sich über den gesamten Bereich der si-Domäne von KCNQ3 erstrecken, sollte daher eine erste Charakterisierung der untereinheitenspezifischen Wechselwirkungsdomäne von KCNQ3 erfolgen. Für die Untersuchung wurden die durch Punktmutation veränderten chimären Untereinheiten von Q1sidQ3 mit dem Proteinrückgrat von KCNQ1 und der si-Domäne von KCNQ3 zusammen mit KCNQ2 in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert und die resultierenden Ströme mit Hilfe der



**Abbildung 3.4: Effekt von Punktmutationen im Bereich der untereinheitenspezifischen Wechselwirkungsdomäne (si-Domäne) von KCNQ1sidQ3 (Q1sidQ3) auf heteromer mit KCNQ2 (Q2) exprimierte KCNQ Kanäle.** Die Abbildung 3.4 zeigt die bei +40mV anhand des chimären KCNQ Kanals Q1sidQ3 (Schwabe et al., 2003) normierten Ströme für die untersuchten Punktmutationen L533W, K544W, R555C, I566F, S587M, M589D, K591H und K594Q bei Q1sidQ3 bei gleichzeitiger Injektion von KCNQ2 in *Xenopus* Oozyten. Das Ergebnis wurde in Form eines Balkendiagramms wiedergegeben. Die Höhe des gemessenen Stroms für den homotetrameren *KCNQ Kanal* KCNQ2 bei einer Spannung von 40mV verdeutlicht den verstärkenden Effekt heteromerer KCNQ Kanäle bestehend aus den beiden  $\alpha$ -Untereinheiten KCNQ2 und KCNQ3 in Bezug auf den resultierenden Kaliumstrom.

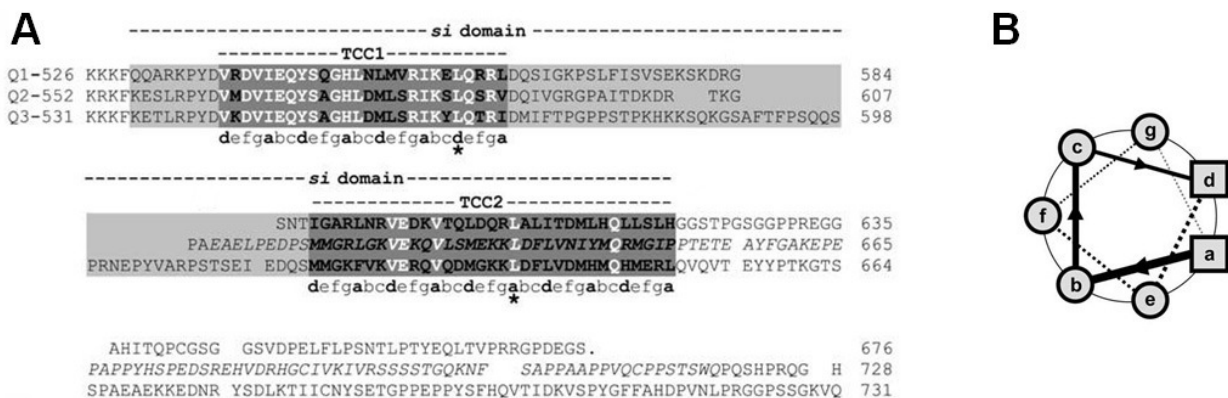
Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode gemessen. Das verwendete Spannungsprotokoll für die elektrophysiologischen Messungen ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

Abbildung 3.4 hingegen gibt einen Überblick über die gemessenen Ströme der in *Xenopus* Oozyten koinjizierten Kanäle. Als Kontrolle dienten nur mit KCNQ2 injizierte Oozyten. Die gemessenen Ströme wurden für den bei einer Spannung von 40mV gemessenen Strom des heteromeren KCNQ Kanals bestehend aus Q1sidQ3 und KCNQ2 normiert. Die vereinzelt gerichteten Punktmutationen für den chimären Kanal von KCNQ1 und KCNQ3 hatten insgesamt keine signifikanten Auswirkungen auf die gemessenen Ströme für den heteromeren Kanal von KCNQ2 und KCNQ3. Lediglich die Punktmutation L533W zeigte einen signifikanten Einfluss auf den gemessenen Strom der mit KCNQ2 koinjizierten Chimäre Q1sidQ3, wobei der gemessene Strom jedoch nicht auf den Wert für den homomeren Kanal von KCNQ2 erniedrigt wurde. Insgesamt konnte mit den im Zusammenhang mit dem *Romano-Ward Syndrom* stehenden Veränderungen der si-Domäne von KCNQ1 kein signifikanter Einfluss auf die Assemblierung des heteromeren KCNQ Kanals von KCNQ3 mit KCNQ2 beobachtet werden.

### 3.1.3 Elektrophysiologische Untersuchungen zur Funktion der beiden untereinheitenspezifischen Wechselwirkungsdomänen TCC1 und TCC2 von KCNQ3 anhand von KCNQ1 und KCNQ3 Chimären

Die bisherigen Untersuchungen anhand von Deletionsmutanten, sowie der durch Punktmutation veränderten chimären Kanäle von KCNQ1 und KCNQ3, führten nicht zu neuen Aussagen in Bezug auf die Art der Wechselwirkungen zwischen den beiden Untereinheiten KCNQ2 und KCNQ3. Jedoch zeigten Untersuchungen zu den Proteinsequenzen für die spannungsabhängigen Kaliumkanäle vom KCNQ-Typ zwei hochgradig helikal spiralisierte Domänen, für die vermutet wurde, dass sie möglicherweise an der Assemblierung von Proteinen beteiligt sein könnten (Jenke et al., 2003).

Diese als TCC-Domänen, vom englischen für *tetramerizing coiled coil*, bezeichneten Strukturen befinden sich demnach innerhalb des C-Terminus der KCNQ Kanäle in dem als si-Domäne bezeichneten Bereich (Schwake et al., 2006). Für Kanäle der EAG-Familie konnte dabei gezeigt werden, dass allein das Vorhandensein einer solchen *coiled coil* Domäne für die Assemblierung von tetrameren EAG1-Kanälen, EAG2-Kanälen und ERG-Kanälen ausreicht (Jenke et al., 2003). KCNQ Kanäle haben zwei solcher TCC-Domänen im Bereich der si-Domäne, TCC1 und TCC2, die über einen kurzen, durchschnittlich 23 bis 30 Aminosäuren großen Abschnitt, voneinander getrennt sind. Für die  $\alpha$ -Untereinheit KCNQ3 ist der zwischen den beiden TCC-Domänen liegende Bereich mit 49 Aminosäuren am längsten (Schwake et al., 2003).



**Abbildung 3.5: Überblick über die TCC-Domänen von KCNQ1, KCNQ2 und KCNQ3 (Schwake et al., 2006).** (A) zeigt einen Sequenzdatenvergleich zwischen den drei Untereinheiten KCNQ1, KCNQ2 und KCNQ3 im Bereich der si-Domäne. In hellgrau erscheint jeweils der gesamte für die Interaktion der Untereinheiten wichtige Bereich. In dunkelgrau sind die beiden TCC-Domänen hervorgehoben. (B) zeigt den schematischen Aufbau der stark helikal gewundenen TCC-Domänen mit der siebenfachen Abfolge an Aminosäuren pro Umlauf (*abcdefg*)<sub>n</sub> und den beiden hydrophoben Aminosäuren an Position a und d. Jeweils 3,6 Aminosäuren werden im Durchschnitt für einen Umlauf der helikal spiralisierten Domäne benötigt.

Dieser Abschnitt entspricht in etwa dem Bereich der bereits zuvor untersuchten Deletionsmutanten von Q1sidQ3, Q1sidQ3delta589, Q1sidQ3delta582 und Q1sidQ3delta575.

Das Vorkommen von *coiled coil* Domänen befähigt eine Reihe von Proteinen zur Multimerisierung (Lupas et al., 1996). Das Vorhandensein zweier *coiled coil* Domänen im Bereich der si-Domäne von KCNQ Kanälen führte daher zu der Annahme, dass die beiden von Jenke et al., 2003 beschriebenen TCC-Domänen möglicherweise zur Assemblierung der KCNQ Untereinheiten beitragen könnten.

Bei diesen zwei superspiralisierten Bereichen TCC1 und TCC2 handelt es sich jeweils um eine  $\alpha$ -helikale Struktur, die durch eine siebenfache Wiederholung von Aminosäuren  $(abcdefg)_n$  mit jeweils einer hydrophoben Aminosäure an Position *a* und *d* zustande kommt (Lupas, 1996). Die übrigen Aminosäuren sind in der Regel hydrophil. Im Mittel sind 3.6 Aminosäuren für einen Umlauf der zumeist rechtsdrehenden Helix nötig, wie in Abbildung 3.5 (B) dargestellt (Lupas, 1996). Das Vorhandensein einer *coiled coil* Struktur bei einem Protein führt oftmals zu einer Interaktion mit einem weiteren *coiled coil* eines weiteren Proteins, was sich zumeist durch eine Dimer- oder auch Multimerisierung von Proteinen auszeichnet. Gekennzeichnet ist dabei das Zusammenwirken der jeweiligen superspiralisierten Domänen aufgrund hydrophiler und hydrophober Wechselwirkungen. Dies wurde für *coiled coil* Domänen beschrieben, die ein Leucin an Position *a* und ein Isoleucin an Position *d* hatten. Ein Austausch an Position *d* von Isoleucin zu Valin begünstigt hingegen die Ausbildung von Trimeren und keinen Tetrameren (Harbury et al., 1993; Lovejoy et al., 1993; Harbury et al., 1994). Darüber hinaus sind die beiden flankierenden Aminosäuren an Position *e* und *g* und die Hydrophobizität des Inneren der superspiralisierten Helix von entscheidender Bedeutung für die Ausbildung von Dimeren oder Tetrameren. Ist der innere Kern der Helix eher polar, dann führt dies zur Ausbildung von Dimeren. Ist der Kern jedoch von hydrophoben Seitenketten geprägt, so kann ein Leucinrest an Position *a* zur Bildung von Tetrameren führen (Lumb und Kim, 1995).

Für eine genauere Untersuchung über die Funktion der beiden TCC-Domänen von KCNQ3 wurden deshalb Chimäre mit KCNQ1 kloniert, bei denen TCC-Domänen von KCNQ1 gegen die TCC Domänen von KCNQ3 ausgetauscht wurden. Eine Chimäre mit der Bezeichnung Q1(TCC1)Q3 enthielt nur den Bereich der ersten TCC-Domäne von KCNQ3 (Aminosäure 543 bis 568). Eine weitere Chimäre, Q1(TCC2)Q3, besaß die zweite TCC-Domäne TCC2 (Aminosäure 618 bis 650) von KCNQ3 im Austausch gegen die zweite TCC Domäne von KCNQ1. Eine dritte Chimäre, Q1(TCC1+TCC2)Q3, enthielt beide TCC-Domänen von



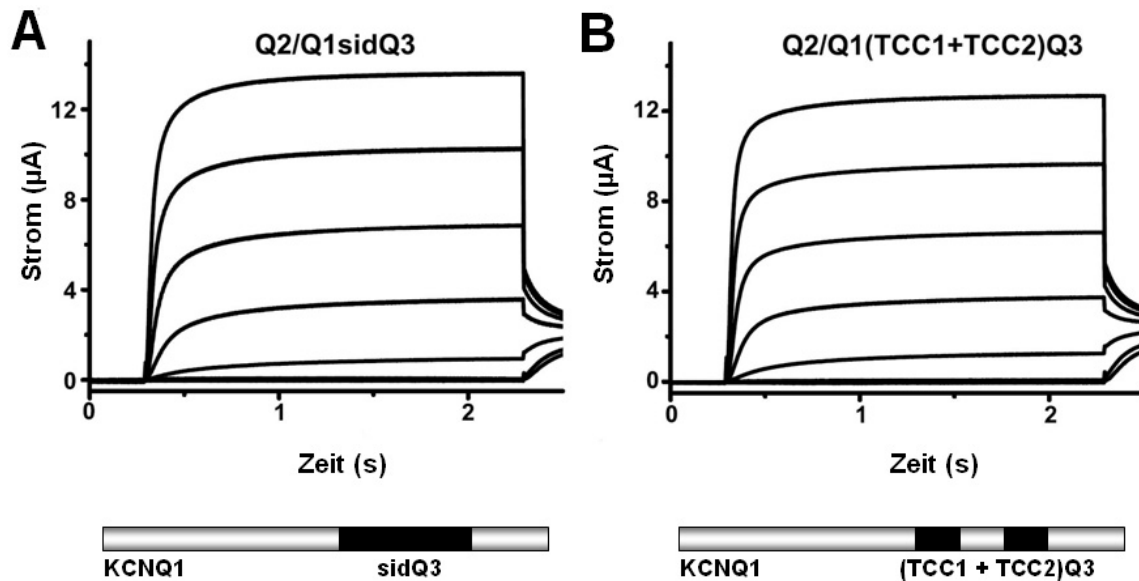


Abbildung 3.6: Übersicht über die gemessenen Ströme für die heteromeren Kanäle Q2/Q1sidQ3, Q2/Q1(TCC1+TCC2)Q3 in *Xenopus* Oozyten. Unter den Stromkurven befindet sich jeweils eine schematische Übersichtszeichnung der untersuchten Chimäre Q1sidQ3 oder Q1(TCC1+TCC2)Q3.

KCNQ3 TCC1 und TCC2, die gegen die entsprechenden TCC-Domänen TCC1 und TCC2 von KCNQ1 ausgetauscht waren. Für elektrophysiologische Untersuchungen wurden sowohl die cRNAs der zu untersuchenden Chimären Q1(TCC1+TCC2)Q3, Q1(TCC1)Q3 und Q1(TCC2)Q3 und als Kontrolle für die Ausbildung eines heterotetrameren *KCNQ* Kanals die cRNA von Q1sidQ3 zusammen mit der cRNA von KCNQ2 in *Xenopus* Oozyten injiziert und die resultierenden Ströme mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode bestimmt. Zusätzlich wurden nur mit cRNA von KCNQ2 injizierte *Xenopus* Oozyten als Vergleich für den Strom des nur homotetrameren Kanals von KCNQ2 verwandt. Als weitere Kontrolle für die beiden nicht heteromer assemblierenden  $\alpha$ -Untereinheiten dienten mit cRNA von KCNQ1 und KCNQ2 koinjizierte *Xenopus* Oozyten. Die Abbildung 3.6 zeigt die repräsentativen Ströme für die untersuchten und in *Xenopus* Oozyten koinjizierten cRNAs von (A) Q1sidQ3 mit Q2, (B) Q1(TCC1+TCC2)Q3 mit Q2.

Abbildung 3.7 stellt die repräsentativen Ströme für (A) Q1(TCC1)Q3 mit Q2 und (B) Q1(TCC2)Q3 mit Q2 dar. Demnach sind die Amplituden für die gemessenen Ströme von Q1sidQ3 mit Q2, Q1(TCC2)Q3 mit Q2 und Q1(TCC1+TCC2)Q3 mit Q2, beispielsweise bei einer Spannung von 40mV, vergleichbar groß. Lediglich der gemessene Strom für Q1(TCC1)Q3 mit Q2 unterscheidet sich deutlich in der Amplitude, beispielsweise für die gemessenen Ströme bei 40mV. Die Amplitude des gemessenen Stroms für Q1(TCC1)Q3 mit Q2 ist vergleichbar mit dem Strom der beiden koinjizierten Untereinheiten KCNQ1 und KCNQ2 und ist damit nur geringfügig im Vergleich zur Amplitude des gemessenen Stroms von KCNQ2 erhöht.

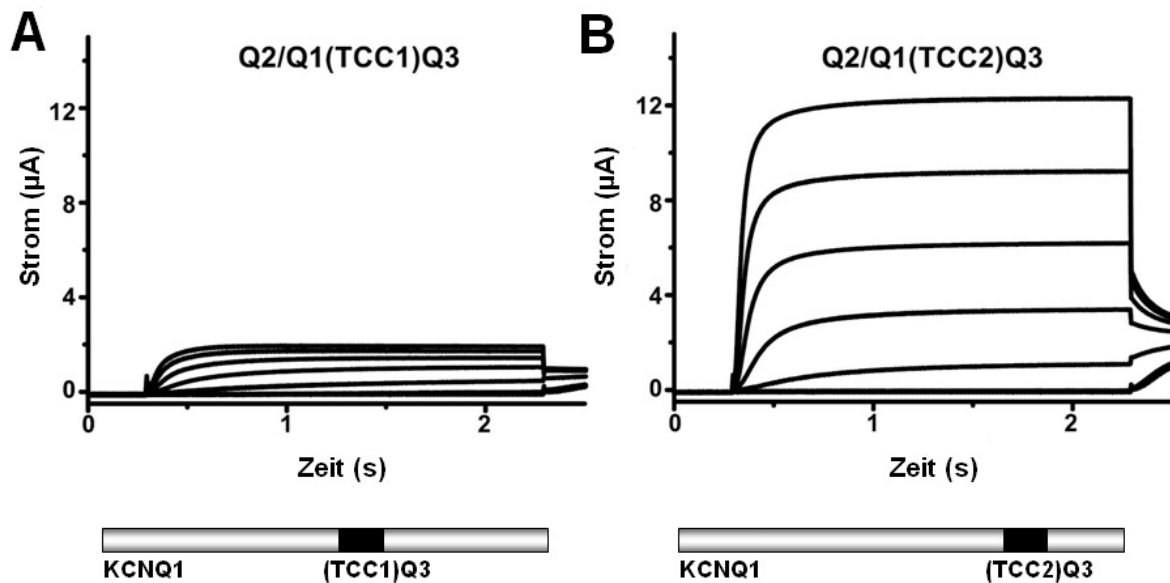


Abbildung 3.7: Übersicht über die gemessenen Ströme für die heteromeren Kanäle  $Q2/Q1(TCC1)Q3$ ,  $Q2/Q1(TCC2)Q3$  in *Xenopus* Oozyten. Unter den Stromkurven befindet sich jeweils eine schematische Übersichtszeichnung der untersuchten Chimäre  $Q1(TCC1)Q3$  oder  $Q1(TCC2)Q3$ .

Die Abbildung 3.8 gibt einen Überblick über die gemessenen Strom-/Spannungskurven von (A)  $Q1(TCC1+TCC2)Q3$  mit  $Q2$ , (B)  $Q1(TCC1)Q3$  mit  $Q2$  und (C)  $Q1(TCC2)Q3$  mit  $Q2$  im Vergleich zu den Strom-/Spannungskurven von  $Q1/Q2$ ,  $Q1sidQ3$  mit  $Q2$  und  $Q2$  allein. Zur

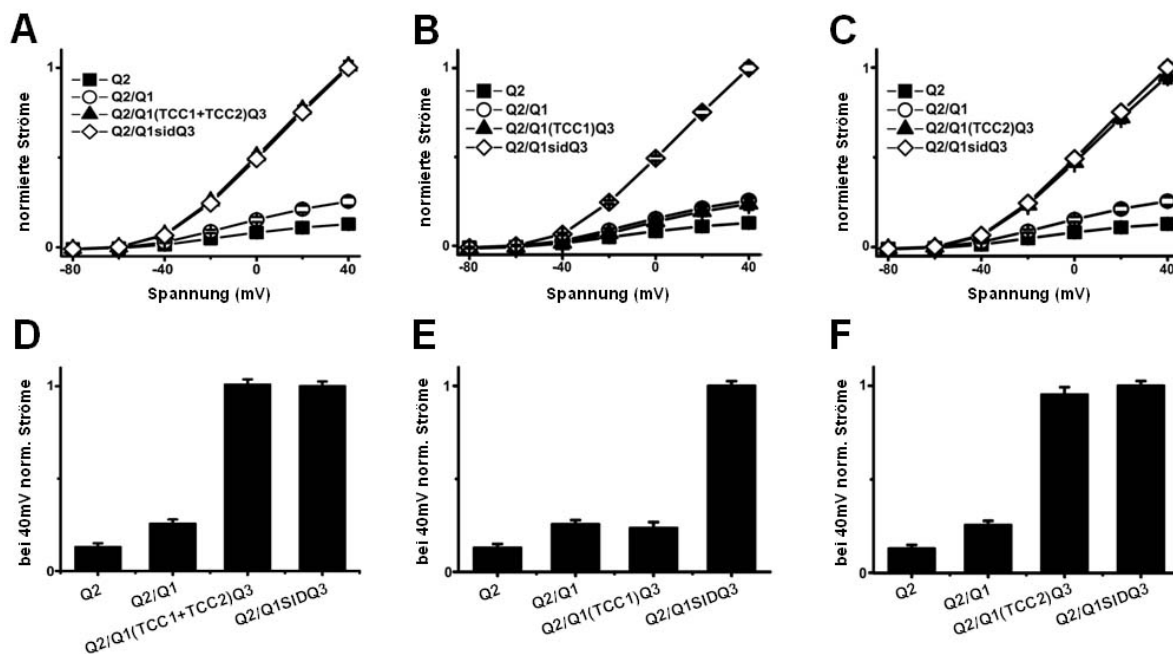
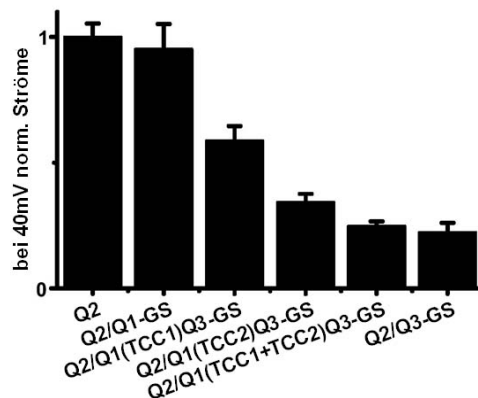


Abbildung. 3.8: Übersicht über die heteromer mit  $KCNQ2$  in *Xenopus* Oozyten exprimierte  $KCNQ$  Kanäle:  $Q2/Q1(TCC1+TCC2)$ ,  $Q2/Q1(TCC2)Q3$  und  $Q2/Q1(TCC2)Q3$ . A-C zeigt die bei 40mV anhand von  $Q2/Q1sidQ3$  normierten Strom/Spannungskurven für (A)  $Q2/Q1(TCC1+TCC2)Q3$ , (B)  $Q2/Q1(TCC1)Q3$  und (C)  $Q2/Q1(TCC2)Q3$  in *Xenopus* Oozyten. D-F zeigt die dazugehörigen Balkendiagramme für die bei 40mV ebenfalls anhand von  $Q2/Q1sidQ3$  normierten Ströme der untersuchten heteromer mit  $KCNQ2$  assemblierten Chimären (D)  $Q2/Q1(TCC1+TCC2)Q3$ , (E)  $Q2/Q1(TCC1)Q3$  und (F)  $Q2/Q1(TCC2)Q3$ . Als Kontrolle diente die homomer exprimierte Untereinheit  $KCNQ2$  und jeweils ein Ansatz, bei dem  $KCNQ2$  mit der nicht heteromer interagierenden  $\alpha$ -Untereinheit  $KCNQ1$  zusammen in *Xenopus* Oozyten koinjiziert wurde.

besseren Unterscheidung wurden ebenfalls in Abbildung 3.8 die bei einer Spannung von 40mV mit Hilfe von Q1sidQ3 mit Q2 normierten Ströme von (D) Q1(TCC1+TCC2)Q3 mit Q2, (E) Q1(TCC1)Q3 mit Q2 und (F) Q1(TCC2)Q3 mit Q2, im Vergleich zu den bei 40mV gemessenen Strömen von Q1/Q2 und Q2 allein in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Anhand dieser Ergebnisse zeigt sich, dass für einen erhöhten Strom und damit für die Interaktion von KCNQ2 mit KCNQ3 allein das Vorhandensein der zweiten TCC-Domäne von KCNQ3 notwendig ist. Die erste TCC-Domäne TCC1 von KCNQ3 hingegen zeigte in den Koinjektionsexperimenten mit KCNQ2 und den Chimären von KCNQ1 und KCNQ3 keinen erhöhten Strom. Unter Umständen kommt daher der ersten TCC-Domäne von KCNQ3 eine andere Funktion in Bezug auf die Assemblierung zu Teil als der zweiten TCC-Domäne von KCNQ3.

### **3.1.4 Effekt der dominant negativen Porenmutation von KCNQ1 auf die mit KCNQ2 koinjizierten Chimären von KCNQ1 und KCNQ3**

Zur weiteren Untersuchung über die Funktion der beiden TCC-Domänen von KCNQ3 wurden in die Chimäre Q1(TCC1)Q3, Q1(TCC2)Q3 und Q1(TCC1+TCC2)Q3 Punktmutationen eingefügt (KCNQ1-G314S), die einen dominant negativen Effekt auf KCNQ1 ausüben (Wollnik et al.,1997) und im Folgenden als Q1(TCC1+TCC2)Q3-G314S, Q1(TCC1)Q3-G314S und Q1(TCC2)Q3-G314S bezeichnet wurden. Zusätzlich als Kontrolle des dominant negativen Effektes wurden die beiden weiteren veränderten Untereinheiten KCNQ1-G314S und KCNQ3-G318S zusammen mit KCNQ2 in *Xenopus* Oozyten koinjiziert. Abbildung 3.9 zeigt die bei 40mV mittels KCNQ2 normierten Ströme für die zusammen mit KCNQ2 in *Xenopus* Oozyten koinjizierten, konstruierten dominant negativen Chimären. Die stärksten Ströme konnten für die allein mit cRNA von KCNQ2 injizierten *Xenopus* Oozyten beobachtet werden. Der Strom der mit KCNQ2 koinjizierten Untereinheiten KCNQ1-G314S war ungefähr vergleichbar mit dem Strom für KCNQ2 und hatte keinen dominant negativen Effekt. Hingegen war der gemessene Strom für KCNQ3-G318S mit KCNQ2 deutlich geringer im Vergleich zum gemessenen Strom von KCNQ2 allein, als Beweis für eine Interaktion von KCNQ2 mit KCNQ3. Auch die gemessenen Ströme der weiteren chimären Kanäle von KCNQ1 und KCNQ3 mit der für KCNQ1 dominant negativen Punktmutation G314S, Q1(TCC2)Q3-G314S und Q1(TCC1+TCC2)Q3-G314S, waren im Vergleich zum gemessenen Strom von KCNQ2 deutlich verringert. Der gemessene Strom für die mit KCNQ2

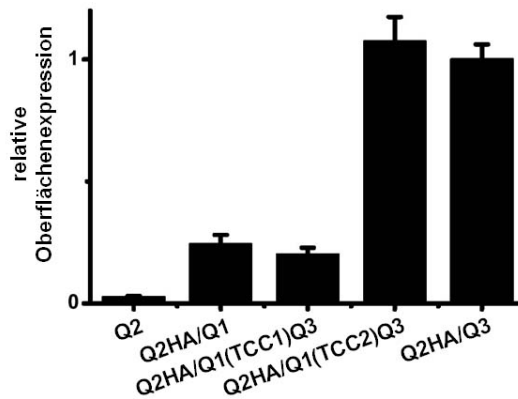


**Abbildung 3.9: Effekt für die Koexpression der dominant negativen Porenmutanten von KCNQ1 mit KCNQ2..** Die gemessenen Ströme für koinjizierte Kanaluntereinheiten KCNQ1-G314S (Q1), Q1(TCC1)Q3-G314S, Q1(TCC2)Q3-G314S, Q1(TCC1+TCC2)Q3-G314S und KCNQ3-G318S (Q3) wurden anhand des Stroms von KCNQ2 bei 40mV Spannung normiert und als Balkendiagramm dargestellt.

koinjizierte Chimäre Q1(TCC1)Q3-G314S war im Vergleich zu dem für KCNQ2 gemessenen Strom ebenfalls um die Hälfte erniedrigt, aber dennoch ungefähr doppelt so groß im Vergleich zu den gemessenen Strömen für die mit KCNQ2 koinjizierten Chimären Q1(TCC1+TCC2)Q3-G314S und Q1(TCC2)Q3-G314S. Die Experimente der Chimäre Q1(TCC1)Q3, Q1(TCC2)Q3 und Q1(TCC1+TCC2)Q3 mit der auf KCNQ1 dominant negativ wirkenden Punktmutation (KCNQ1-G314S) zeigten unabhängig voneinander, dass für eine vollständige Heteromerisierung wie sie für KCNQ2 und KCNQ3 beobachtet wird, allein die zweite TCC-Domäne von KCNQ3 befähigt ist. Die weitere TCC-Domäne TCC1 von KCNQ3 besitzt eine eher untergeordnete Rolle in Bezug auf die Heteromerisierung und erfüllt möglicherweise eine andere Funktion, beispielsweise bei der Homotetramerisierung von KCNQ3, weswegen weitere Versuche zur Funktion der TCC-Domänen von KCNQ3 folgten.

### 3.1.5 Relative Oberflächenexpression der KCNQ1/KCNQ3 Chimären

Wie von Schwake et al., 2003 gezeigt wurde, geht der für die in *Xenopus* Oozyten koinjizierten Kanäle Q1sidQ3 mit KCNQ2 gemessene, ungefähr zehnfach im Vergleich zu den allein injizierten Untereinheiten von KCNQ2 und KCNQ3 verstärkte Strom auf eine erhöhte Oberflächenexpression der beiden koinjizierten Kanäle Q1sidQ3 und KCNQ2 zurück. Um zu überprüfen, ob der für die Chimäre Q1(TCC2)Q3 zusammen mit KCNQ2 erhöhte Strom eventuell in Zusammenhang mit einer ebenfalls gesteigerten Oberflächenexpression steht, wurde die Oberflächenexpression der Chimären von KCNQ1 und KCNQ3, Q1(TCC1)Q3



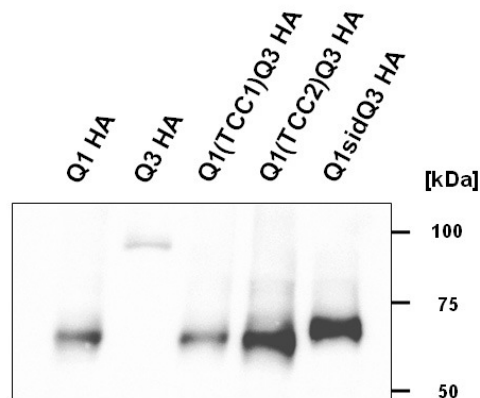
**Abbildung. 3.10: Relative Oberflächenexpression der KCNQ1/KCNQ3 Chimären.** Die relative Oberflächenexpression für Q2HA/Q1(TCC1)Q3 und Q2HA/Q1(TCC2)Q3 wurde auf den Wert des HA markierten und der mit KCNQ3 koinjizierten Untereinheit KCNQ2 normiert. Als Kontrolle diente zum einen die nicht HA markierte Untereinheit von KCNQ2, sowie die beiden nicht heteromer assemblierenden Untereinheiten KCNQ1 und KCNQ2HA.

und Q1(TCC2)Q3, die zusammen mit der HA markierten Untereinheit von KCNQ2 in *Xenopus* Oozyten koinjiziert wurden, untersucht. Die Abbildung 3.10 gibt die relativen Einheiten für die Oberflächenexpression der untersuchten Chimären Q1(TCC1)Q3 und Q1(TCC2)Q3 in Form eines Balkendiagramms wieder. Die für die Chimären bestimmte relative Oberflächenexpression wurde anhand der Oberflächenexpression von KCNQ3 zusammen mit KCNQ2 normiert. Als Kontrolle für die Oberflächenexpression diente zum einen der homomere Kanal von KCNQ2HA, sowie die nicht heteromer assemblierenden Untereinheiten von KCNQ1 und KCNQ2HA in koinjizierten *Xenopus* Oozyten. Eine erhöhte Oberflächenexpression konnte dabei sowohl für die heteromer assemblierenden Untereinheiten von KCNQ2HA und KCNQ3, als auch für die Chimäre Q1(TCC2)Q3 mit KCNQ2HA nachgewiesen werden. Die ebenfalls mit KCNQ2HA in *Xenopus* Oozyten koinjizierte Chimäre Q1(TCC1)Q3 brachte hingegen keine erhöhte Oberflächenexpression.

Diese Experimente zeigen daher insgesamt einen Effekt für die zweite TCC-Domäne von KCNQ3 auf die heteromere Assemblierung mit KCNQ2. Eine verstärkte Oberflächenexpression konnte nur für Q1(TCC2)Q3 mit KCNQ2HA beobachtet werden. Die Chimäre Q1(TCC1)Q3 scheint nicht für die heteromere Assemblierung mit KCNQ3 notwendig zu sein, wie die Experimente mit den Chimären Q1(TCC1+TCC2)Q3, Q1(TCC1)Q3 und Q1(TCC2)Q3 und dem dominant negativen Effekt auf KCNQ1 bestätigen.

### 3.1.6 Koimmunpräzipitationsexperimente von KCNQ2 mit den Chimären von KCNQ1 und KCNQ3

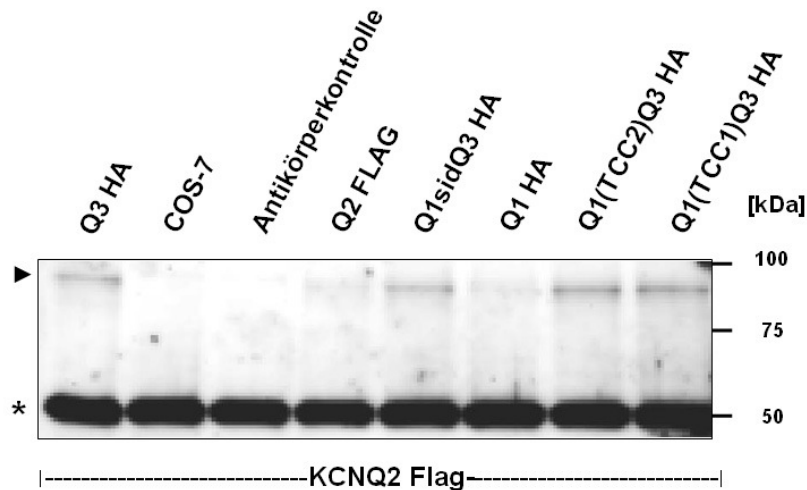
Die durch elektrophysiologische Untersuchungen in injizierten *Xenopus laevis* Oozyten erzielten Ergebnisse zeigen die Notwendigkeit des Vorhandenseins der carboxyterminal gelegenen, hochgradig helikal spiralisierten TCC-Domäne TCC2 im Bereich der untereinheitenspezifischen Wechselwirkungsdomäne (si-Domäne) für die Assemblierung der heteromeren KCNQ Kanäle bestehend aus KCNQ2 und KCNQ3. Um diesbezüglich unterstützende Aussagen zu erhalten, wurden die bereits elektrophysiologisch untersuchten Chimären von



**Abbildung 3.11: Western-Blot Analyse der Expression der carboxyterminal HA markierten Chimären Q1(TCC1)Q3 und Q1(TCC2)Q3.** Zusätzlich wurden die weiteren Kanaluntereinheiten KCNQ1 (Q1) und KCNQ3 (Q3), sowie die Chimäre Q1sidQ3 ebenfalls carboxyterminal HA markiert und transient in COS-7 Zellen transfiziert. Jeweils 30µg Gesamtprotein pro Ansatz wurden in eine Tasche eines achtprozentigen Polyacrylamidgels geladen und durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Charakterisierung erfolgte unter Verwendung des Anti HA Antikörpers 3F10 (Roche, Mannheim, Deutschland).

KCNQ1 und KCNQ3, Q1(TCC1)Q3 und Q1(TCC2)Q3 und die von Schwake et al., 2003 beschriebene weitere Chimäre Q1sidQ3 zusätzlich carboxyterminal HA markiert und durch eine transiente Transfektion in COS-7 Zellen überexprimiert. Die Abbildung 3.11 zeigt die mit Hilfe des Anti HA Antikörpers 3F10 (Kapitel 2.1.12; Material und Methoden) in einer Western Blot Analyse nachgewiesenen Chimären Q1(TCC1)Q3HA, Q1(TCC2)Q3HA und Q1sidQ3HA, sowie die ebenfalls carboxyterminal markierten KCNQ Kanäle KCNQ1HA und KCNQ3HA. Die Signale für die Chimären Q1(TCC1)Q3HA, Q1(TCC2)Q3HA und Q1sidQ3HA, sowie für KCNQ1HA sind gegenüber dem Signal für KCNQ3HA deutlich gesteigert. Eventuell steht der für KCNQ1 und die Chimäre beobachtete Effekt in Zusammenhang mit einer verstärkten Expression von KCNQ1 im Vergleich zu KCNQ3, was möglicherweise mit der nur für KCNQ1 beschriebenen N-Glykosylierungsstelle in Zusammenhang stehen könnte.

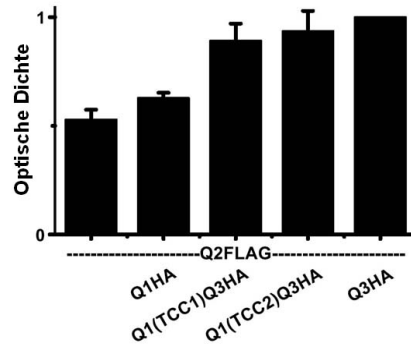
Durch Koimmunpräzipitationsexperimente der carboxyterminal HA markierten Chimären



**Abbildung 3.12: Koimmunpräzipitationsexperimente mit aminoterminal FLAG markiertem KCNQ2 (Q2) und den HA markierten Chimären Q1(TCC1)Q3 und Q1(TCC2)Q3.** Plasmid DNA von Q3HA, Q1sidQ3HA, Q1(TCC1)Q3HA, Q1(TCC2)Q3HA und Q1HA wurde mit KCNQ2FLAG in COS-7 Zellen kotransfiziert. Anschließend erfolgte eine Immunpräzipitation der HA markierten Proteine mit dem monoklonalen 3F10 Antikörper (Roche, Deutschland, Mannheim). Der Immunpräzipitationsansatz wurde mittels Western Blot Analyse unter Verwendung des Anti-FLAG Antikörpers (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) charakterisiert. Der Pfeil zeigt die Signale für die FLAG markierten KCNQ2 Monomere. Der Stern markiert die schwere Kette des 3F10 Antikörpers. Als Kontrolle dienten nicht transient transfizierte COS-7 Zellen, sowie ein Ansatz mit lediglich 3F10 Antikörper ohne COS-7 Zellextrakt.

von KCNQ1 und KCNQ3 mit der aminoterminal markierten Untereinheit KCNQ2 sollte jedoch zuerst die heteromere Assemblierung von KCNQ2 und KCNQ3 nachgewiesen werden. Dafür wurden COS-7 Zellen mit KCNQ2FLAG und den zu untersuchenden Chimären von KCNQ1, entweder mit der gesamten si-Domäne von KCNQ3, Q1sidQ3HA, nur mit der ersten TCC-Domäne von KCNQ3, Q1(TCC1)Q3HA, oder aber nur mit der zweiten TCC-Domäne von KCNQ3, Q1(TCC2)Q3HA, kotransfiziert. Als Kontrolle dienten zum einen nur mit KCNQ2FLAG transient transfizierte COS-7 Zellen, sowie nicht transfizierte COS-7 Zellen. Als weitere Kontrollen wurden die beiden nicht heteromer assemblierenden Untereinheiten KCNQ1HA und KCNQ2FLAG transient in COS-7 Zellen transfiziert. Nach einer achtundvierzigstündigen Expression wurden die Zellen geerntet und die präparierten Membranproteine mit Hilfe des 3F10 Anti HA Antikörpers präzipitiert. Anschließend erfolgte eine Charakterisierung der präzipitierten Membranpräparationen für die kotransfizierten KCNQ Kanäle durch Western Blot Analyse. Als weitere Kontrolle diente ein Präzipitationsexperiment, bei dem lediglich 3F10 Anti HA Antikörper ohne zusätzliche Membranproteine präzipitiert wurde.

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des M2 Anti FLAG Antikörpers. Die Abbildung 3.12 zeigt das Ergebnis für die durchgeführten Koimmunpräzipitationsexperimente. Mit dem Anti FLAG Antikörper M2 konnte nach erfolgter Koimmunpräzipitation mit dem Anti HA Antikörper 3F10 ein Signal für die zusammen mit KCNQ2FLAG kotransfizierte Untereinheit



**Abbildung 3.13: Densiometrische Bestimmung von drei unterschiedlichen Western Blot Analysen nach erfolgter Koimmunpräzipitation.** Die Ergebnisse für die Koimmunpräzipitation der HA markierten Chimären Q1(TCC1)Q3 und Q1(TCC2)Q3 mit KCNQ2FLAG wurden anhand der bestimmten Werte für Q3HA/Q2FLAG normiert und in Form eines Balkendiagramms wiedergegeben.

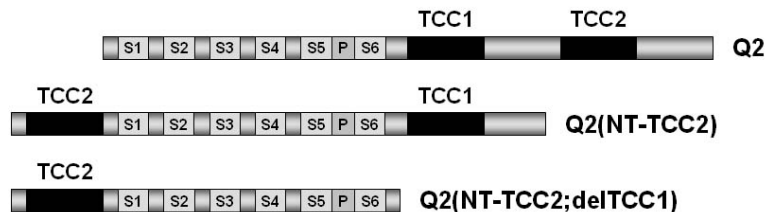
KCNQ3HA und für die Chimären Q1sidQ3HA, Q1(TCC1)Q3HA und Q1(TCC2)Q3HA nachgewiesen werden. Dies ist ein weiteres Indiz für die Interaktion der Chimären mit KCNQ2. Mit KCNQ2FLAG allein oder zusammen mit KCNQ1HA transient transfizierte COS-7 Zellen zeigten nur schwache Signale unter Verwendung des M2 Anti FLAG Antikörpers für das präzipitierte KCNQ2FLAG. Für nicht transient transfizierte COS-7 Zellen, sowie für das weitere Kontrollexperiment lediglich mit dem 3F10 Antikörper, ohne zusätzliches Membranprotein, ließ sich kein Signal unter Verwendung des M2 Anti FLAG Antikörpers nachweisen, was für sehr stringente Waschbedingungen spricht. Deshalb sind die beobachteten positiven Signale insgesamt auch eher schwach zu erkennen. Die Immunpräzipitationsversuche wurden daher mehrfach wiederholt, um die beobachteten Ergebnisse zu bekräftigen. Abbildung 3.13 zeigt die densitometrische Bestimmung von drei unterschiedlichen Western Blot Analysen nach erfolgter Koimmunpräzipitation der HA markierten Chimären Q1(TCC1)Q3 und Q1(TCC2)Q3 mit Q2FLAG. Die Wiederholung der Präzipitationsexperimente führte zu denselben Beobachtungen wie zuvor. Ein Signal für das FLAG markierte KCNQ2 ließ sich nur mit den Chimären Q1sidQ3HA, Q1(TCC1)Q3HA, Q1(TCC2)Q3HA und für die  $\alpha$ -Untereinheit KCNQ3HA nachweisen. Für zusammen mit KCNQ1HA und KCNQ2FLAG kotransfizierte COS-7 Zellen konnte nach anschließender Western Blot Analyse mit dem M2 Anti FLAG Antikörper kein eindeutiges Signal, wie es für mit KCNQ3HA und KCNQ2FLAG kotransfizierte COS-7 Zellen beobachtet wurde, festgestellt werden. Im Gegensatz zu den elektrophysiologischen Experimenten konnte durch die biochemische Methode der Koimmunpräzipitation eine Interaktion sowohl der ersten, als auch der zweiten TCC-Domäne, TCC1 und TCC2 von KCNQ3 mit KCNQ2 nachgewiesen werden. Durch dieses interessante Ergebnis wird daher angenommen, dass die erste TCC-



Domäne von KCNQ3 ebenfalls einen Anteil an der heteromeren Assemblierung hat, die zweite TCC-Domäne TCC2 dabei aber eine übergeordnete Rolle spielt.

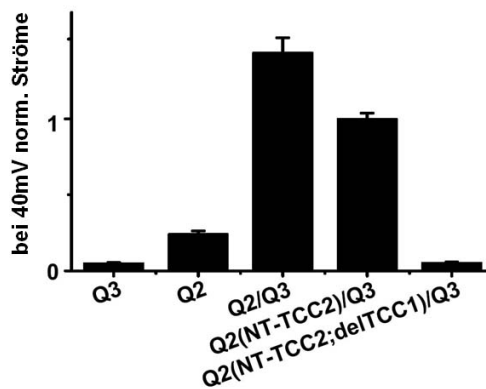
### 3.1.7 Untersuchungen zur Funktion und Positionierung der super-spiralisierten Tetramerisierungsdomäne TCC2 am Beispiel von KCNQ2

Die bisherigen elektrophysiologischen Untersuchungen der si-Domäne von KCNQ3 haben gezeigt, dass sowohl die erste TCC-Domäne TCC1, als auch die zweite TCC-Domäne TCC2 von KCNQ3 einen Einfluss auf die Heteromerisierung mit KCNQ2 ausüben. Dabei blieb aber



**Abbildung. 3.14: Schematische Darstellung von KCNQ2, Q2(NT-TCC2) und Q2(NT-TCC2;delTCC1).** Abgebildet sind die sechs Transmembrandomänen S1 bis S6, sowie die zwischen den beiden Transmembrandomänen S5 und S6 befindliche Porenregion der drei unterschiedlichen KCNQ2 Kanäle. Die schwarzen Kästen symbolisieren die hochgradig spiralisierten TCC-Domänen TCC1 und TCC2. Q2(NT-TCC2) besitzt im Gegensatz zum KCNQ2 Wildtyp die erste TCC-Domäne TCC1 am C-Terminus und die zweite TCC-Domäne TCC2 am N-Terminus. Q2(NT-TCC2;delTCC1) besitzt hingegen nur die zweite TCC-Domäne TCC2 aminoterminal gelegen. Die erste TCC-Domäne wurde für Q2(NT-TCC2;delTCC1) entfernt.

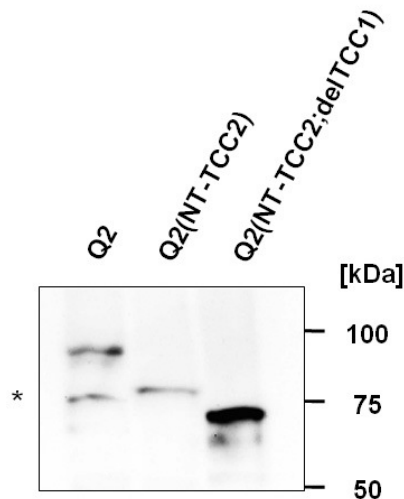
die genauere Funktion der TCC-Domänen TCC1 und TCC2 ungeklärt. Ungewiss blieb auch die Frage der Positionierung der beiden TCC-Domänen, ob sie miteinander interagieren und wenn ja, ob sie in unmittelbarer Nähe zueinander stehen müssen, um für eine korrekte Assemblierung zu sorgen. Für Kanäle von der Art der Shaker-Kanäle konnte ein aminoterminal gelegener Bereich, auch als T1-Region bezeichnet, identifiziert werden, der für die Bildung von tetrameren Kanälen verantwortlich ist (Strang et al., 2001). Die bisherigen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die zweite TCC-Domäne von KCNQ3 einen stärkeren Effekt auf die heteromere Assemblierung der beiden  $\alpha$ -Untereinheiten KCNQ2 und KCNQ3 ausübt. Für weitere Untersuchungen diesbezüglich wurden deshalb veränderte Kanäle von KCNQ2 konstruiert, bei denen die zweite TCC-Domäne TCC2 an den N-Terminus versetzt und als Q2(NT-TCC2) bezeichnet wurde.



**Abbildung 3.15: Koinjektion von KCNQ2, Q2(NT-TCC2) und Q2(NT-TCC2;delTCC1) mit KCNQ3.** Die für Q2(NT-TCC2)/Q3 bei 40mV normierten Ströme wurden in Form eines Balkendiagramms wiedergegeben. Als Kontrolle dienten entweder nur mit KCNQ2 oder mit KCNQ3 injizierte *Xenopus* Oozyten.

Des weiteren wurde ein veränderter Kanal von KCNQ2 synthetisiert, bei dem die zweite TCC-Domäne TCC2 an den N-Terminus versetzt und die erste TCC-Domäne deletiert war. Die Abbildung 3.15 gibt einen Überblick über die für KCNQ2 synthetisierten Kanäle Q2(NT-TCC2) und Q2(NT-TCC2;delTCC1) im Vergleich zum unveränderten Kanal von KCNQ2. Durch Koinjektionsexperimente zusammen mit KCNQ3 in *Xenopus* Oozyten sollte die Möglichkeit zur heteromeren Assemblierung der beiden veränderten KCNQ Kanäle Q2(NT-TCC2) und Q2(NT-TCC2;delTCC1) untersucht werden. Die Abbildung 3.16 zeigt das Ergebnis der elektrophysiologischen Untersuchung für die beiden veränderten KCNQ Kanäle Q2(NT-TCC2) mit Q3 und Q2(NT-TCC2;delTCC1) mit KCNQ3. Als Kontrolle dienten mit cRNA von KCNQ2 und KCNQ3 koinjizierte *Xenopus* Oozyten, sowie nur mit KCNQ2 cRNA oder KCNQ3 cRNA injizierte Oozyten. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der bei einer Spannung von 40mV gemessenen Werte für die injizierten cRNAs, wobei die Ströme anhand des Ergebnisses für die beiden koinjizierten KCNQ Kanäle Q2(NT-TCC2) und Q3 normiert wurden. Die stärksten Ströme konnten für mit KCNQ2 cRNA und KCNQ3 cRNA koinjizierte *Xenopus* Oozyten beobachtet werden. Aber auch der veränderte Kanal von KCNQ2 -Q2(NT-TCC2)- zeigte bei Koinjektion mit KCNQ3 deutlich verstärkte Ströme im Vergleich zu den beiden allein mit cRNA von KCNQ2 oder KCNQ3 injizierten *Xenopus* Oozyten. Einzig der ebenfalls veränderte Kanal von KCNQ2 -Q2(NT-TCC2;delTCC1)- zeigte bei Koinjektion mit KCNQ3 in *Xenopus* Oozyten keinen verstärkten Strom, wie er für heteromere Kanäle von KCNQ2 und KCNQ3 beobachtet werden konnte.

Demnach scheint die Position der zweiten TCC-Domäne am C-Terminus von KCNQ2 nicht notwendig für eine Interaktion mit KCNQ3. Eine Deletion der ersten TCC-Domäne TCC1 von KCNQ2 verhindert jedoch die Interaktion von KCNQ2 mit KCNQ3, was auf die Notwendigkeit des Vorhandenseins beider TCC-Domänen, TCC1 und TCC2 von KCNQ2 für

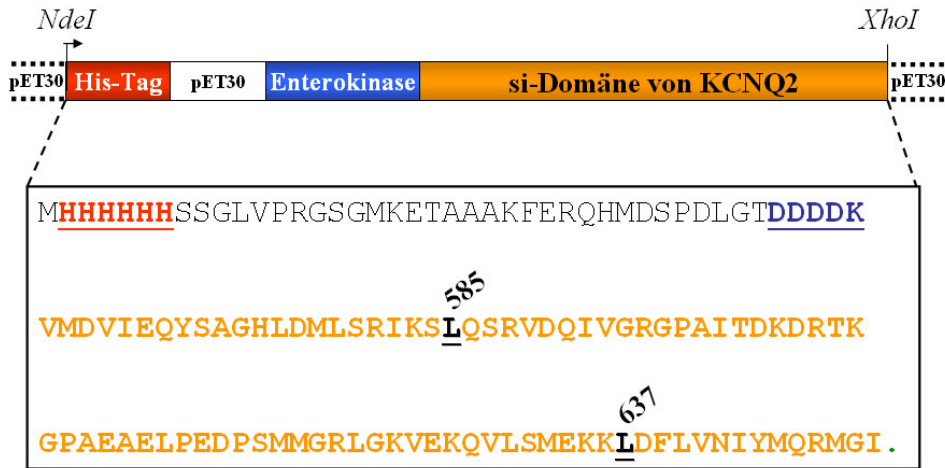


**Abbildung 3.16: Expressionskontrolle von KCNQ2, Q2(NT-TCC2) und Q2(NT-TCC2;delTCC1).** cRNAs von KCNQ2, Q2(NT-TCC2) und Q2(NT-TCC2;delTCC1) wurden in *Xenopus* Oozyten injiziert. Anschließend erfolgte eine Western Blot Analyse für die präparierten Oozyten. Die Charakterisierung der KCNQ2 Kanäle geschah unter Verwendung des Anti KCNQ2 (N19) Antikörpers (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, USA). Das Sternchen kennzeichnet ein Artefakt für KCNQ2, wobei es sich möglicherweise um ein Abbauprodukt des Wildtypkanals handelt.

eine Interaktion mit KCNQ3 hindeutet. In anschließenden Western Blot Analysen konnte die Expression der beiden veränderten Kanäle von KCNQ2 mit der aminoterminal gelegenen TCC-Domäne TCC2, Q2(NT-TCC2) und Q2(NT-TCC2;delTCC1) nachgewiesen werden. Die Abbildung 3.1.5.3 zeigt die erhaltenen Signale für mit cRNA von KCNQ2, Q2(NT-TCC2) und Q2(NT-TCC2;delTCC1) injizierte, anschließend präparierte und durch Western Blot Analyse charakterisierte *Xenopus* Oozyten.

### 3.1.8 Untersuchungen zur si-Domäne von KCNQ2 anhand rekombinanter Proteine aus *E.coli*

Die bisherigen Ergebnisse deuten auf die vermittelnde Wirkung der TCC-Domänen in Bezug auf die Multimerisierung von KCNQ Kanälen, weswegen im Folgenden die Assemblierung von KCNQ2 auf proteinbiochemischem Weg verfolgt werden sollte. Für eine genauere Untersuchung der Funktion der si-Domäne in Bezug auf die Assemblierung der fünf KCNQ  $\alpha$ -Untereinheiten, wurde deshalb der gesamte 86 Aminosäuren große Bereich der si-Domäne von KCNQ2 von V536 bis einschließlich I622 in *E.coli* transformiert und rekombinant mit Hilfe des PET-30 Vektorsystems zur gesteigerten Proteinexpression synthetisiert. Zusätzlich wurde aminoterminal eine Hexa-Histidin Markierung eingefügt, die ebenfalls eine Enterokinaseerkennungssequenz enthält. Das synthetisierte rekombinante Protein mit der si-

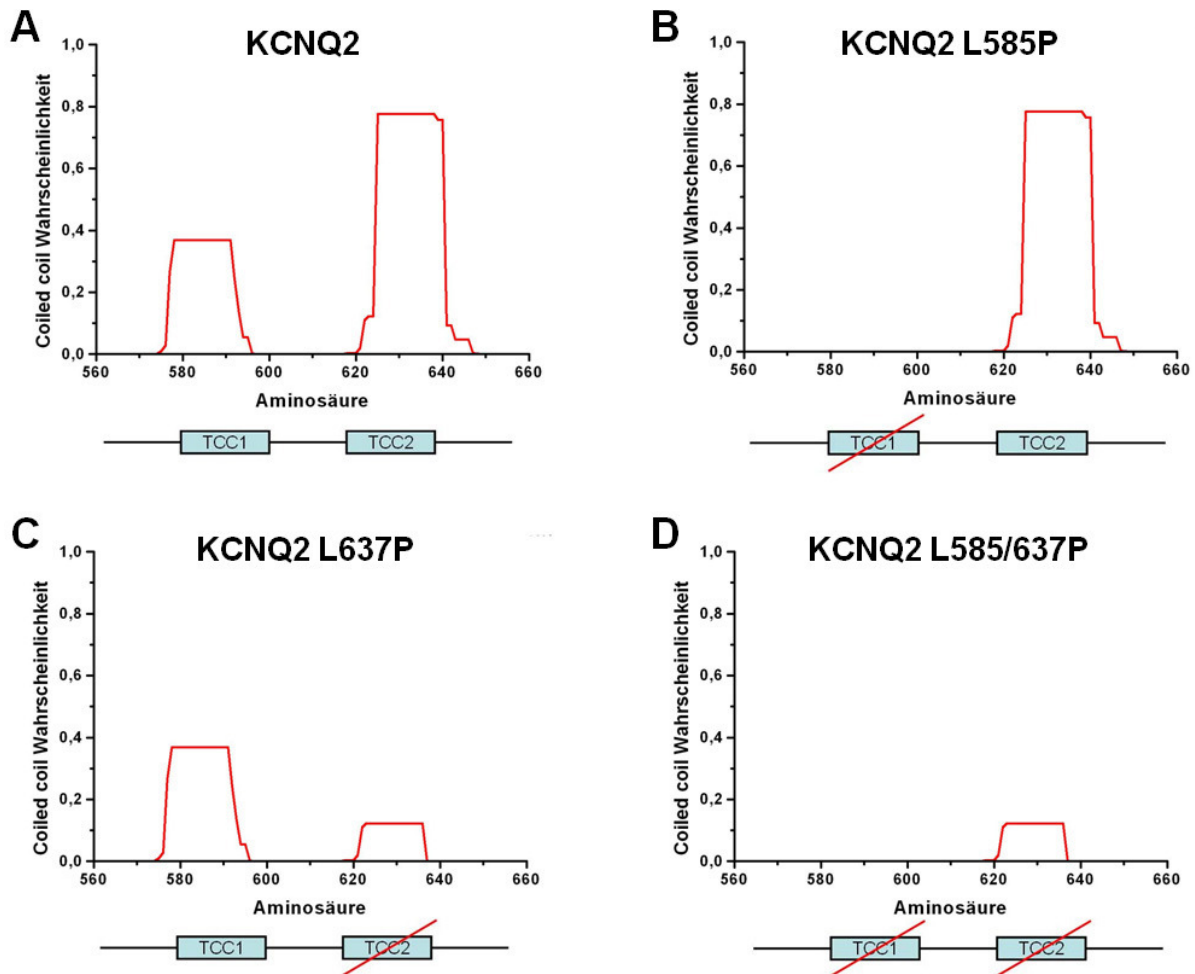


**Abbildung 3.17: Schematische Übersichtszeichnung über die in *E.coli* produzierten rekombinanten Proteine zur Untersuchung der untereinheitenspezifischen Interaktionsdomäne von KCNQ2.** Für die Untersuchung der si-Domäne von KCNQ2 wurden 14,6kDa große rekombinante Proteine synthetisiert, die die Proteininformation ab Aminosäure 564 bis 650 enthielten und zusätzlich aminoterminal HIS markiert waren. Ein rekombinantes Protein enthielt die beiden unveränderten TCC-Domänen TCC1 und TCC2 von KCNQ2. Ein weiteres rekombinantes Protein besaß zwei Punktmutationen, sowohl in der ersten TCC-Domäne, TCC1, als auch in der zweiten TCC-Domäne, TCC2, wobei die beiden Leucinreste einmal an Position 585 und des weiteren an Position 637 gegen ein Prolin ausgetauscht wurden. Der gezielte Austausch der Leucinreste an den beiden Positionen 585 und 637 zu einem Prolin sollte mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zu einer Aufhebung der hochgradig helikal spiralisierten Struktur der beiden TCC-Domänen führen.

Domäne von KCNQ2 hatte dabei eine Größe von 14,6kDa. Die Abbildung 3.17 gibt einen Überblick über die unter Verwendung des pET30 Vektors rekombinant in *E.coli* hergestellte si-Domäne von KCNQ2.

Die Aufreinigung des rekombinanten Proteins mit der si-Domäne von KCNQ2 geschah aus Zelleinschlusskörpern von *E.coli*. Zusätzlich wurden drei weitere rekombinante Proteine mit der si-Domäne von KCNQ2 in *E.coli* synthetisiert, bei denen entweder die helikal spiralisierte dreidimensionale Struktur der ersten TCC-Domäne TCC1 von KCNQ2 durch eine Punktmutation des Leucins an Position 585 zu einem Prolin, die helikal spiralisierte dreidimensionale Struktur der zweiten TCC-Domäne TCC2 von KCNQ2 durch eine Punktmutation des Leucins an Position 637 zu einem Prolin, oder aber beide TCC-Domänen der si-Domäne von KCNQ2 durch das gleichzeitige Einfügen der beiden Punktmutationen und des Austauschs der beiden Leucine an den Positionen 585 und 637 zu einem Prolin unterbrochen wurde.

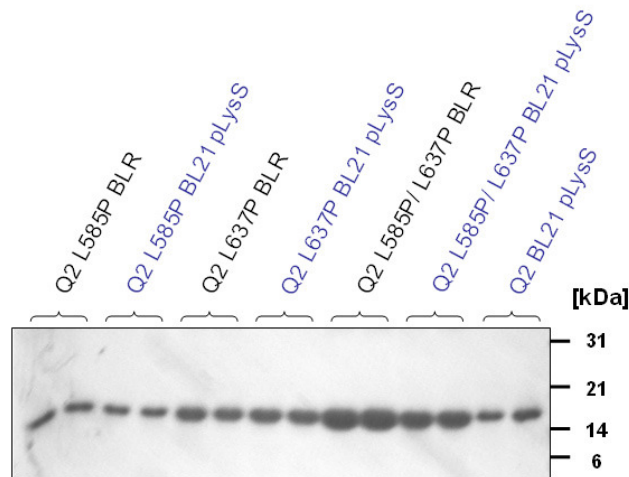
Die Abbildung 3.18 gibt einen Überblick über die insgesamt vier verschiedenen für die si-Domäne von KCNQ2 rekombinant in *E.coli* synthetisierten Proteine. Die Bestimmung der für eine Aufhebung der hochgradig helikal spiralisierten TCC-Domänen TCC1 und TCC2 von KCNQ2 möglichen Aminosäuren, erfolgte unter Verwendung eines von Lupas et al., 1991 beschriebenen Algorithmus. Danach führt der bereits beschriebene Austausch der beiden



**Abbildung 3.18:** Graphische Darstellung über die coiled coil Wahrscheinlichkeit für die si-Domäne der rekombinant in *E.coli* hergestellten Proteinfragmente von KCNQ2. (A) Proteinfragment von KCNQ2 und der weiteren rekombinant in *E.coli* hergestellten Proteinfragmente mit den Punktmutationen L585P (B), L637P (C) und L585/637P (D). Die Berechnung der Wahrscheinlichkeit für die hochgradig spiralisierte „tetramerizing coiled coil“ Struktur erfolgte anhand eines von Andre Lupas 1991 entwickelten Algorithmus.

flexiblen Leucinreste an den Positionen 585 und 637 gegen zwei Prolinreste zu einer Abnahme der Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung der helikal spiralisierten TCC-Domänen. Der Einfachheit halber wurden die rekombinant in *E.coli* hergestellten und aus Zelleinschlusskörpern aufgereinigten Proteine mit der unveränderten si-Domäne von KCNQ2 als KCNQ2, mit der Punktmutation L585P in TCC1 als KCNQ2L585P, mit der Punktmutation L637P in TCC2 als KCNQ2L637P und mit der Doppelmutation L585/637P als KCNQ2L585/637P benannt. Die Abbildung 3.18 gibt einen Überblick über die mit Hilfe des Computerprogramms COILS Version 2.2 [<http://www.ch.embnet.org>] unter Verwendung des von Lupas et al., 1991 entwickelten Algorithmus getroffenen Aussagen zur Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von TCC-Domänen.

Demnach wird die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung einer TCC-Domäne durch den Austausch des Leucins an Position 585 zu einem Prolin für die erste TCC-Domäne TCC1 insgesamt aufgehoben, da der Wert für die Ausbildung einer TCC-Domäne von 37% auf 0%

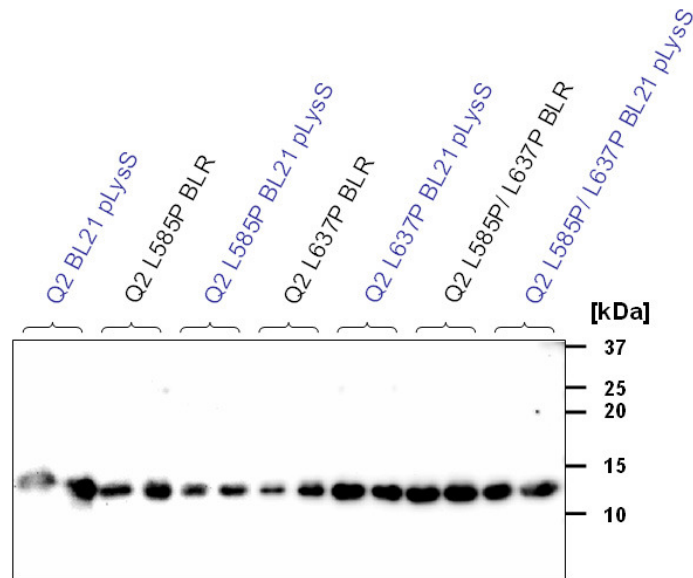


**Abbildung 3.19: Coomassie gefärbtes Polyacrylamidgel mit den gereinigten rekombinanten Proteinen aus Zelleinschlusskörpern von *E.coli*.** Die Synthese der unter 3.6.1 beschriebenen rekombinanten Proteine von KCNQ2 erfolgte in den beiden *E.coli* Stämmen BLR(DE3) und BL21(DE3)pLysS nach Induktion mit 1M IPTG. 10µg der gereinigten Zelleinschlusskörper wurden mit Probenauftragspuffer versehen und auf ein SDS-Polyacrylamidgel (20%) auftragen und anschließend mit Coomassie-Färbelösung gefärbt. Die Aufnahme des Coomassie gefärbten Gels erfolgte durch eine schwarz-weiß Video-Dokumentationsanlage (Intas, Göttingen, Deutschland).

abnimmt. Der Bereich der zweiten TCC-Domäne hingegen bleibt durch die Punktmutation L585P unverändert und besitzt, wie es für die unveränderte si-Domäne errechnet wurde, einen Wert von 78%.

Der Austausch des einen Leucins an Position 637 der si-Domäne von KCNQ2 gegen ein Prolin senkt die Wahrscheinlichkeit über die Ausbildung einer TCC-Domäne für die zweite TCC-Domäne TCC2 von 78% auf einen Wert von 18%. Die Wahrscheinlichkeit über die Ausbildung der ersten coiled coil Domäne (TCC2) liegt jedoch für die Punktmutante L637P, genau wie für die TCC-Domäne TCC2 der unveränderten si-Domäne von KCNQ2, bei einem Wert von 37%. Der Austausch beider Leucinreste an den Positionen 585 (TCC1) und 637 (TCC2) zu Prolinen verhindert insgesamt die Ausbildung der helikal spiralisierten TCC-Domäne TCC1 und erniedrigt die Wahrscheinlichkeit über die Ausbildung einer super helikal spiralisierten TCC-Domäne TCC2 auf einen Wert von 18%. Somit ist es für das rekombinante Protein mit der si-Domäne von KCNQ2 und den beiden Punktmutationen L585P und L637P insgesamt unwahrscheinlich, dass eine helikale dreidimensionale Struktur vorliegt. Nur das rekombinante Protein mit der unveränderten si-Domäne von KCNQ2 besitzt eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von zwei TCC-Domänen TCC1 und TCC2 und somit für die verstärkte Möglichkeit von Proteininteraktionen.

Die Abbildung 3.19 zeigt die rekombinant in *E.coli* synthetisierten, aus Zelleinschlusskörpern rekombinant in *E. coli* synthetisierten Proteine mit der Punktmutation L585P, der Punkt-



**Abbildung 3.20: Western Blot Analyse der in *E.coli* synthetisierten rekombinanten Proteine mit der si-Domäne von KCNQ2.** Die bereits unter 3.6.1 beschriebenen rekombinanten Proteine mit der si-Domäne von KCNQ2 wurden nach Induktion mit 1M IPTG in den *E.coli* Stämmen BLR(DE3) und BL21(DE3)pLysS synthetisiert und aus Zelleinschlusskörpern gereinigt. 10µg des rekombinanten Hexa-HIS markierten Proteins wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel (20%) aufgetragen. Die anschließende Western Blot Analyse erfolgte unter Verwendung eines Anti Histidin Antikörpers (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland).

gereinigten Proteine mit der unveränderten si-Domäne von KCNQ2, sowie die weiteren mutation L637P und die durch die beiden Doppelmutationen L585P und L637P veränderte si-Domäne von KCNQ2. Die Proteine wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel (20%) aufgetragen und durch Elektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde das SDS-Polyacrylamidgel mit den darin befindlichen und gereinigten Proteinen durch eine Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Es waren nur die gereinigten Monomere mit der si-Domäne von KCNQ2 nachweisbar.

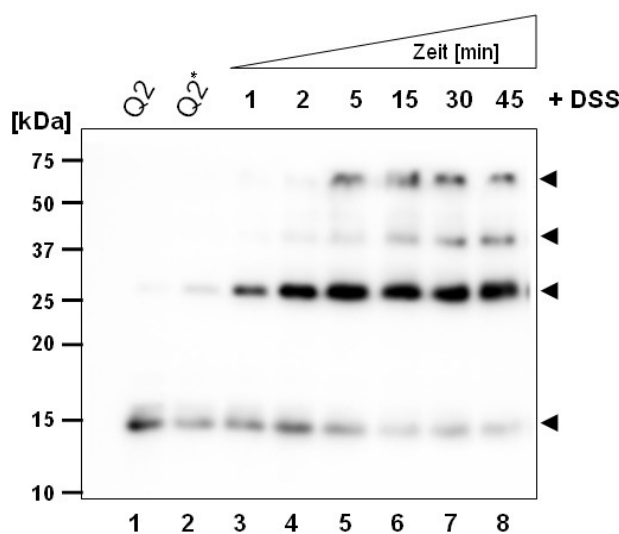
Zusätzlich wurden die aus Zelleinschlusskörpern von *E.coli* gereinigten Proteine mit der si-Domäne von KCNQ2 durch eine Western Blot Analyse unter Verwendung eines Anti Hexa-Histidin Antikörpers charakterisiert. Die Abbildung 3.20 zeigt das Ergebnis für die Western Blot Analyse der gereinigten Zelleinschlusskörper mit der entweder durch Punktmutation veränderten oder aber unveränderten si-Domäne von KCNQ2. Auch hier erkennt der Anti Hexa-Histidin Antikörper nur die Monomere der gereinigten rekombinanten Proteine mit der si-Domäne von KCNQ2.

Mit Hilfe des PET-30 Vektorsystems gelang es, die si-Domäne von KCNQ2 rekombinant in *E.coli* Stämmen zu synthetisieren. Die Proteine wurden anschließend aus Zelleinschlusskörpern von *E.coli* gereinigt und in PBS Puffer gelöst. Nach Behandlung mit reduzierendem Probenpuffer konnte sowohl in Coomassie gefärbten SDS-Gelen, als auch in Western Blot Analysen das gereinigte Monomer dieses rekombinanten Proteins mit der si-Domäne von KCNQ2 nachgewiesen werden und stand daher für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

### 3.1.9 Experimente zur Vernetzung der Wechselwirkungsdomäne von KCNQ2 mit rekombinantem Protein aus *E.coli*

Die aus Zelleinschlusskörpern von *E.coli* gereinigten rekombinanten Proteine mit der unveränderten si-Domäne von KCNQ2 wurden darauf in Vernetzungsexperimenten mit der aminospezifischen, homobifunktionalen Quervernetzungs-substanz *Disuccinimidylsuberate* (DSS) für verschieden lange Zeitintervalle vernetzt, um die Assemblierung zum Tetramer *in vitro* zu untersuchen.

Aufgrund des sehr geringen Durchmessers der Vernetzungssubstanz DSS entsprach der Abstand der *in vitro* vernetzten rekombinanten Proteine mit der si-Domäne von KCNQ2 nur ungefähr 11Å bis 12Å, wodurch die *in vivo* Assemblierung der Monomeren KCNQ Untereinheiten hin zum tetrameren Kanal gut nachgeahmt werden konnte. Die Quervernetzung der Monomere konnte durch eine 1M Lysinstopplösung zu beliebigen Zeitpunkten beendet werden, so dass neben dem Monomer der si-Domäne KCNQ2 auch das Dimer, Trimer und ein putatives Tetramer nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 3.21: Quervernetzungsexperiment mit dem gereinigten rekombinanten Protein aus *E.coli* zur Charakterisierung der si-Domäne von KCNQ2.** Die Quervernetzung erfolgte mit der aminospezifischen Quervernetzungs-substanz DSS für unterschiedlich lange Zeiträume von 1min, 2min, 5min, 15min, 30min und 45min. Durch die Zugabe von 1M Lysin wurde die Reaktion gestoppt. \*Bahn 2 zeigt das Ergebnis für die Vernetzung mit DSS bei vorheriger Zugabe der 1M Lysin Stopplösung. Bahn 1 zeigt rekombinantes Protein, das ohne die Quervernetzungs-substanz DSS aufgetragen wurde. Die Pfeile kennzeichnen sowohl die Signale für die monomere, als auch für die putative dimere, trimere und tetramere Form des rekombinant in *E.coli* hergestellten Proteins mit der si-Domäne von KCNQ2.

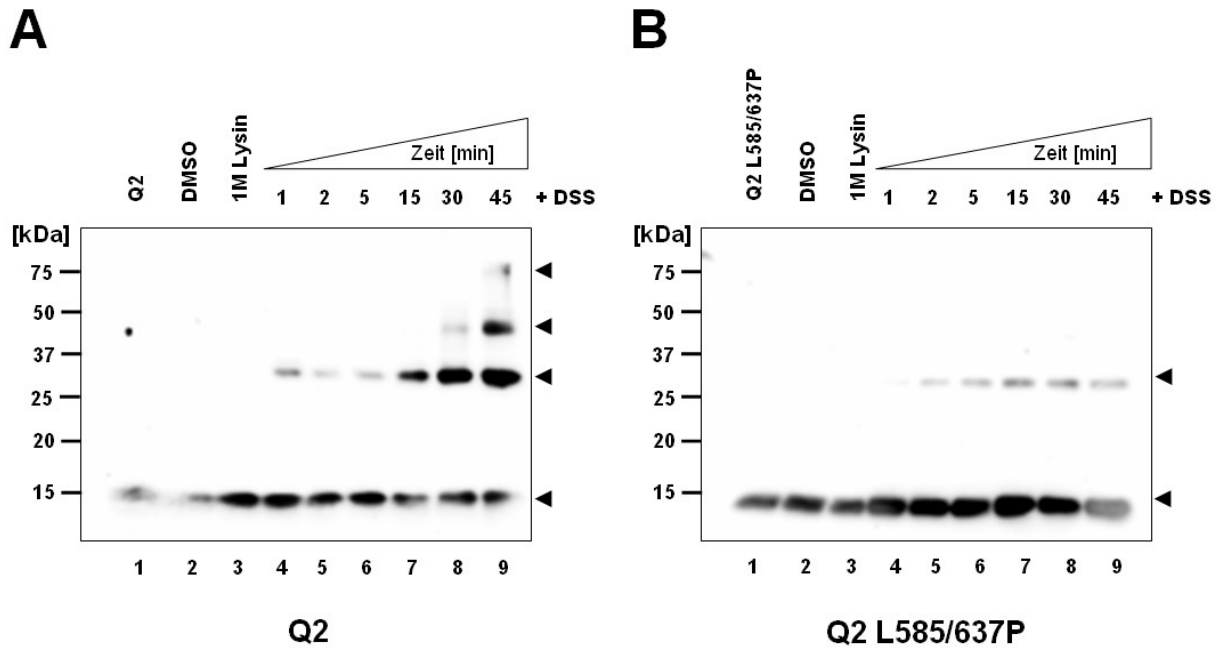
Die Abbildung 3.21 zeigt das Ergebnis für ein Vernetzungsexperiment mit der aus Zelleinschlusskörpern von *E.coli* gereinigten si-Domäne von KCNQ2 und der Quervernetzungs-substanz DSS. Die Vernetzung erfolgte für 1min, 2min, 5min, 15min, 30min und 45min. Als Kontrolle diente zum einen nicht mit DSS vernetztes rekombinantes Protein mit der si-



Domäne von KCNQ2, zum anderen ein Ansatz, bei dem zuerst die 1M Lysinstopplösung und erst anschließend DSS hinzugefügt wurde. Die Auswertung der Quervernetzungsexperimente erfolgte durch Western Blot Analysen mit dem Anti Hexa-Histidin Antikörper. Nach einer einminütigen Inkubation mit der Vernetzungssubstanz DSS sind Signale bei 15kDa und bei ungefähr 30kDa zu erkennen, die aufgrund ihrer Größe dem Monomer und dem Dimer der quervernetzten si-Domäne von KCNQ2 zuzuordnen sind. Nach einer fünfminütigen Inkubation mit DSS sind neben den beiden Signalen bei 15kDa und 30kDa weitere Signale bei 45kDa und bei ungefähr 70kDa bis 75kDa zu erkennen. Bei diesen handelt es sich aufgrund der im Western Blot identifizierten Signale möglicherweise um das Trimer und das Tetramer, oder aber auch Pentamer der mit DSS quervernetzten si-Domäne von KCNQ2. Nach einer fünfundvierzigminütigen Inkubation mit DSS sind besonders starke Signale für das Dimer der vernetzten si-Domäne von KCNQ2 zu erkennen. Auch die Signale für das putative Trimer und Tetramer, bzw. Pentamer sind deutlich ausgeprägter. Das Signal für das Monomer der rekombinant synthetisierten si-Domäne von KCNQ2 hingegen nimmt stark ab im Vergleich zu den beobachteten Signalen des Monomers nach einminütiger bzw. fünfminütiger Inkubation mit DSS. Die Kontrolle ohne DSS zeigt im Western Blot nur ein Signal für das Monomer und die weitere Kontrolle, bei der erst die 1M Lysinstopplösung und erst danach DSS hinzugefügt wurde, zeigt hauptsächlich ein Signal für das monomere rekombinante Protein mit der si-Domäne von KCNQ2 und nur ein schwaches Signal bei 30kDa für das Dimer des rekombinanten Proteins.

Mit Hilfe der Quervernetzungssubstanz DSS konnte die homotetramere Assemblierung von KCNQ2 *in vitro* nachvollzogen werden. Interessant blieb allerdings die Frage, wie sich die durch Punktmutation veränderten rekombinanten Proteine bei Quervernetzungsexperimenten verhalten, da durch das Austauschen der beiden Leucine an den Positionen 585 und 637 gegen die beiden Prolinreste die helikale Struktur der coiled coil Domänen nach dem von Lupas et al., 1991 aufgestellten Algorithmus nahezu aufgehoben werden sollte. Durch das Aufheben der helikalen Struktur sollte demnach ebenfalls die Möglichkeit zur Assemblierung verhindert werden. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurden gleichzeitig die rekombinant in *E.coli* synthetisierte unveränderte, als auch die durch die beiden Punktmutationen L585P und L637P veränderte si-Domäne von KCNQ2 mit DSS in Quervernetzungsexperimenten untersucht.

Die Abbildung 3.22 zeigt das Ergebnis für zwei parallel durchgeführte Quervernetzungs-experimente. Die Abbildung 3.22 (A) zeigt die Quervernetzung der rekombinant in *E.coli*



**Abbildung 3.22: Vergleichende Analyse zur Quervernetzung der in *E.coli* hergestellten rekombinanten Proteine mit der si-Domäne von KCNQ2 (A), sowie der Doppelmutante mit den beiden Punktmutationen L585P und L637P (B).** Beide Quervernetzungsexperimente wurden parallel zueinander durchgeführt. Bahn 1 zeigt jeweils das nicht mit DSS vernetzte rekombinante Protein. Die mit DMSO bezeichnete Bahn 2 zeigt die Quervernetzungsansätze bei denen das DSS gegen DMSO ausgetauscht wurde. Bahn 3 dient als Kontrolle der 1M Lysin Stopplösung. Für den Quervernetzungsansatz wurde zuerst 1M Lysin hinzugefügt, dann erst das DSS. Die Bahnen 4 bis 9 zeigen Quervernetzungsexperimente mit den unterschiedlichen Wirkungszeiten von 1min, 2min, 5min, 15min, 30min und 45min. Die Pfeile zeigen für (A) die putativen Signale für die monomere, dimere, trimere und tetramere Form des quervernetzten rekombinanten Proteins. Für (B) sind lediglich die beiden Signale für das Monomer und das Dimer der rekombinant in *E.coli* hergestellten si-Domäne mit den beiden Punktmutationen L585P und L637P nachweisbar.

synthetisierten unveränderten si-Domäne von KCNQ2. Als Kontrolle diente wiederum nicht mit DSS, sondern zuerst mit 1M Lysin und erst dann mit DSS behandeltes rekombinantes Protein mit der si-Domäne von KCNQ2. Als weitere Kontrolle diente ein Versuchsansatz, bei dem das für DSS verwendete Lösungsmittel DMSO allein zu dem rekombinanten Protein mit der si-Domäne von KCNQ2 gegeben wurde. Die Vernetzung erfolgte für 1min, 2min, 5min, 15min, 30min und 45min. Nach einminütiger Inkubation mit DSS sind neben dem Monomer auch das Dimer des rekombinanten Proteins mit der si-Domäne von KCNQ2 zu erkennen. Nach dreißigminütiger Inkubation mit DSS wird ein weiteres Signal bei 45kDa erkennbar, bei dem es sich höchst wahrscheinlich um das Trimer des gereinigten rekombinanten Proteins handelt. Nach einer fünfundvierzigminütigen Inkubation mit DSS ist neben dem Signal bei 15kDa für das Monomer, dem Signal bei 30kDa für das Dimer und dem Signal bei 45kDa für das putative Trimer des rekombinanten Proteins auch ein Signal bei 75kDa erkennbar, das dem putativen Tetramer bzw. dem putativen Pentamer des rekombinanten Proteins mit der si-Domäne zugeordnet werden kann.

Die Abbildung 3.22 (B) zeigt die Quervernetzung der rekombinanten in *E. coli* synthetisierten si-Domäne von KCNQ2 mit den beiden Punktmutationen L585P und L637P in den beiden TCC-Domänen TCC1 und TCC2 von KCNQ2. Für das parallel durchgeführte Quervernetzungs-experiment mit gereinigtem rekombinanten Protein mit den beiden Punktmutationen L585P und L637P ergibt sich im Gegensatz zu Abbildung 3.22 (A) ein unterschiedliches Ergebnis. Nach der einminütigen Inkubation mit DSS ist nur das Monomer des untersuchten rekombinanten Proteins Q2L585/637P zu erkennen. Erst nach zweiminütiger Inkubation mit DSS ist neben dem Monomer ein weiteres Signal bei 30kDa für das putative Dimer des rekombinanten Proteins Q2L585/637P zu erkennen. Auch nach einer fünfundvierzig-minütigen Inkubation mit DSS ist kein weiteres Signal für ein putatives Trimer und Tetramer bzw. Pentamer nachweisbar. Die Stärke des Dimers nimmt auch nach fünfundvierzig Minuten Inkubation mit der Vernetzungssubstanz DSS nicht signifikant zu, sondern bleibt über die beobachteten Zeitintervalle von 2min bis 45min nahezu gleich. Im Gegensatz zum Vernetzungsexperiment in 3.22 (A) mit der unveränderten si-Domäne von KCNQ2 ist das Signal des Monomers für das rekombinante Protein mit den beiden Punktmutationen L585P und L637P deutlich gesteigert.

Es konnte daher gezeigt werden, dass durch das Einfügen der beiden Punktmutationen L585P und L637P für KCNQ2 die Möglichkeit zur homomeren Assemblierung mit der homo-bifunktionalen Quervernetzungs-substanz herabgesetzt wird. Zwar konnte für die durch Punktmutationen veränderte si-Domäne von KCNQ2 mit DSS eine Dimerisierung beobachtet werden, jedoch konnte auch nach einer 45min Inkubation kein putatives Tetramer wie für die unveränderte si-Domäne von KCNQ2 beobachtet werden. Möglicherweise bewirkt das Einfügen der beiden Punktmutationen L585P und L637P in die si-Domäne von KCNQ2 daher tatsächlich die Aufhebung der helikalen Struktur für die beiden coiled coil Domänen, so dass der kurze Abstandshalter DSS nicht wie im Fall der nativen si-Domäne von KCNQ2 wirken kann und daher nur wenige der durch Punktmutation veränderten rekombinanten Proteine an den aminoterminalen Enden unspezifisch miteinander vernetzt werden.

### **3.1.10 Experimente zur N-Glykosylierung von KCNQ1**

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die untereinheitenspezifische Wechselwirkungsdomäne (si-Domäne) mit den zwei darin befindlichen Tetramerisierungsdomänen TCC1 und TCC2 für die homomere und heteromere Assemblierung der beiden KCNQ Kanäle KCNQ2 und KCNQ3 notwendig ist. Die gemessenen Ströme für die Chimären von KCNQ1

und KCNQ3 zusammen mit KCNQ2 sind gegenüber den homomeren Kanälen von KCNQ2 und KCNQ3 um den Faktor zehn in ihrer Amplitude verstärkt. In diesem Zusammenhang wurde sowohl für die heteromer mit KCNQ2HA assemblierte Chimäre Q1(TCC2)Q3, als auch für die beiden heteromer assemblierenden KCNQ Kanäle KCNQ2 und KCNQ3 eine erhöhte Oberflächenexpression nachgewiesen. Der Zusammenbau der heteromeren Kanäle von KCNQ2 und KCNQ3 erfolgt höchstwahrscheinlich im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Dort erfolgt aber nicht nur der Zusammenbau von Proteinen, auch die zusätzliche Modifikation von Transmembranproteinen, durch das Anheften von Zuckerresten, findet im ER statt. KCNQ1 besitzt im Gegensatz zu den übrigen KCNQ Kanälen eine N-Glykosylierungsstelle, die auch in den untersuchten Chimären Q1(TCC1)Q3, Q1(TCC2)Q3 und Q1(TCC1+TCC2)Q3 vorhanden ist. KCNQ1 ist die einzige KCNQ  $\alpha$ -Untereinheit mit einer N-glykosydischen Modifikationsstelle im Bereich zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne S5 und S6. Finley et al., 2002 konnten für Membranpräparationen aus dem Atrium, dem ventriculären Endocardium und dem Epicardium des Pferdeherzens in Experimenten mit und ohne N-Glykosidase F zwei Formen, eine N-glykosylierte (75kDa) und eine deglykosylierte Form (60kDa) von KCNQ1 belegen.

Die N-glykosydische Modifikation lässt sich nur für die extrazellulären Bereiche von Transmembranproteinen nachweisen und erfolgt durch eine Oligosaccharyltransferase im Endoplasmatischen Retikulum von eukaryotischen Zellen (Yan und Lennarz, 2004). Ein Vergleich der insgesamt N-glykosylierten und nicht glykosylierten Proteine könnte möglicherweise Erkenntnisse über die Dauer des Aufenthalts für die bereits elektrophysiologisch charakterisierten Chimären Q1(TCC1)Q3, Q1(TCC2)Q3 und Q1(TCC1+TCC2)Q3 im ER geben. Gleichzeitig könnte untersucht werden, ob die im Zusammenhang mit der zweiten TCC-Domäne beobachtete erhöhte Oberflächenexpression aufgrund einer stärkeren Assemblierung zustande kommt. Um weitere Rückschlüsse über die heteromere Assemblierung der beiden KCNQ Kanäle KCNQ2 und KCNQ3 zu erhalten, sollte deshalb die Interaktion der N-glykosylierten Chimären von KCNQ1 und KCNQ3 mit KCNQ2 anhand von vergleichenden Western Blot Analysen untersucht werden.

Die für die Untersuchung der Interaktion von KCNQ2 und KCNQ3 bereits hergestellten Chimären von KCNQ1 und KCNQ3 besaßen die N-Glykosylierungsseite an Position N289 von KCNQ1.

Für die Überprüfung der N-Glykosylierung von KCNQ1 und den Chimären von KCNQ1 und KCNQ3, Q1SIDQ3, Q1(TCC1)Q3, Q1(TCC2)Q3 wurden die Kanäle zusätzlich carboxy-terminal mit einer HA Erkennungssequenz versehen und transient in COS-7 Zellen

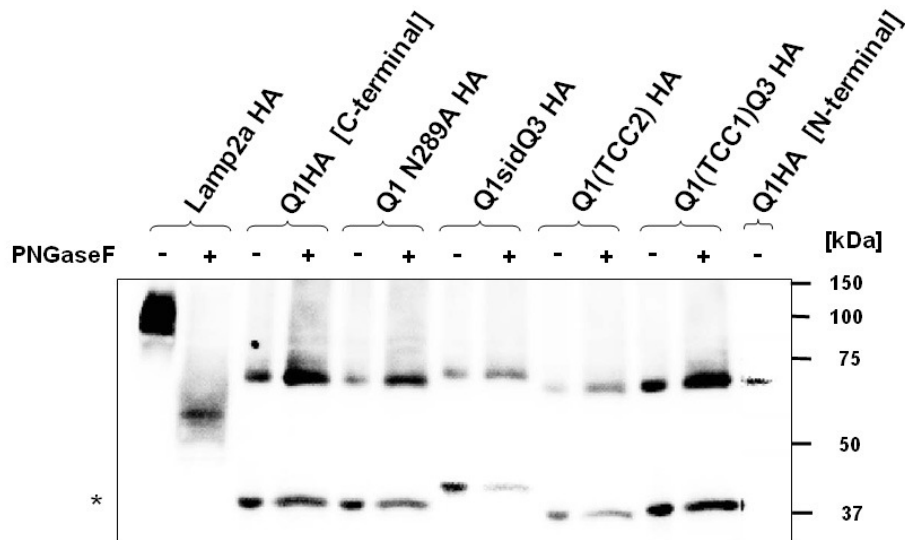
transfiziert. Die Membranfraktionen wurden präpariert und in zwei Versuchsansätze aufgeteilt. Eine Hälfte wurde mit N-Glykosidase F behandelt, um eine eventuelle N-glykosydische Modifikation und damit zusätzlich vorhandene Zuckerreste zu entfernen, die zweite Fraktion hingegen blieb zur Kontrolle unbehandelt. Als Kontrolle diente zusätzlich die sowohl aminoterminal, als auch carboxyterminal markierte Untereinheit KCNQ1, sowie eine durch Punktmutation veränderte Untereinheit N289A von KCNQ1, bei der die putative N-Glykosylierungsstelle inaktiviert wurde. Als weitere Kontrolle diente das stark glykosylierte Lysosomen assoziierte Membranprotein 2a (Lamp2a), das ebenfalls in zwei Ansätzen mit und ohne N-Glykosidase F untersucht wurde. Die Abbildung 3.4.1 gibt einen Überblick über die



**Abbildung 3.23: Darstellung der Aminosäure- und Nukleotidabfolge für den Wildtyp von KCNQ1, sowie für den veränderten Kanal KCNQ1N289A.** Durch den Austausch des Asparagins an Position 289 durch einen Alaninrest sollte die putative N-Glykosylierungsstelle von KCNQ1 ausgeschaltet werden.

N-Glykosylierungsstelle von KCNQ1 und die durch eine Punktmutation veränderte Untereinheit von KCNQ1 N289A.

Nach erfolgter Behandlung mit N-Glykosidase F wurden die Proben mit Auftragspuffer versehen und durch eine Western Blot Analyse mit dem 3F10 Anti-HA-Antikörper charakterisiert. Die Abbildung 3.24 zeigt das Ergebnis der Western Blot Analyse. Für die transient in COS-7 Zellen transfizierten und HA markierten Kanäle von Q1(TCC1)Q3HA und Q1(TCC2)Q3HA, für den durch Punktmutation veränderten Kanal KCNQ1-N289A, als auch für den carboxyterminal HA markierten Kanal KCNQ1HA konnte kein Unterschied zwischen der mit N-Glykosidase F behandelten und unbehandelten Probe erkannt werden. Die Größe der mit N-Glykosidase F behandelten und der unbehandelten Probe entsprach einer Größe von 60kDa bis 70kDa, im Gegensatz zu den beiden von Finley et al., 2002 für das Herz von Pferden beobachteten, glykosylierten und deglykosylierten Formen von KCNQ1. Einzig die mit der gegen die um fünfundzwanzig Aminosäuren größere si-Domäne von KCNQ3 ausgetauschte Chimäre von KCNQ1 -Q1SIDQ3HA- unterschied sich bei der Western Blot Analyse von den übrigen Chimären von KCNQ1 und KCNQ3, Q1(TCC1)Q3HA und Q1(TCC2)Q3HA, sowie von KCNQ1 in der Größe der beobachteten Signale. Aber auch für



**Abbildung 3.24:** Experimente zur putativen N-Glykosylierung von KCNQ1 unter Verwendung von PNGaseF behandelten Membranpräparationen transient transfizierter COS-7 Zellen. Die aminoterminal und carboxyterminal HA markierte  $\alpha$ -Untereinheit KCNQ1, die im Bereich der N-Glykosylierungsstelle veränderte Punktmutante von KCNQ1 Q1N289A und die Chimären von KCNQ1 und KCNQ3 Q1SIDQ3, Q1(TCC1)Q3 und Q1(TCC2)Q3 wurden mit PNGaseF behandelt, daneben befindet sich jeweils eine weitere unbehandelte Probe. Zur Kontrolle wurde das stark glykosylierte Lysosomen assoziierte Membranprotein 2a (Lamp2a) mit PNGaseF behandelt. Der Stern zeigt ein für alle carboxyterminal markierten KCNQ1 Proteine spezifisch auftretendes Artefakt.

Q1SIDQ3HA unterschied sich die mit N-Glykosidase F behandelte Probe nicht von der unbehandelten Probe. Dafür zeigte das stark glykosylierte Lysosomen assoziierte Membranprotein 2a (Lamp2a) für die mit N-Glykosidase F behandelte und unbehandelte Probe zwei unterschiedlich große Signale. Das HA markierte und ohne N-Glykosidase F behandelte Protein Lamp2aHA zeigt in der Western Blot Analyse ein Signal bei ungefähr 100kDa. Das mit N-Glykosidase F behandelte Protein von Lamp2aHA zeigt ein Signal bei ungefähr 55kDa. Dies beweist, dass der PNGaseF Verdau unter den gewählten Versuchsbedingungen funktioniert.

Interessanterweise präsentieren alle carboxyterminal HA markierten Kanäle von KCNQ1 ein diskretes Signal bei ungefähr 40kDa. Auch die im Gegensatz zu KCNQ1 um 25 Aminosäuren größere Chimäre Q1SIDQ3 zeigt das für die anderen carboxyterminal markierten Kanäle von KCNQ1 spezifische Signal, allerdings ein um einige kDa verschobenes und größeres Signal bei ungefähr 45kDa. Im Gegensatz zu den carboxyterminal markierten Kanälen von KCNQ1 offenbart das aminoterminal HA markierte Protein KCNQ1HA kein diskretes Signal bei 40kDa.

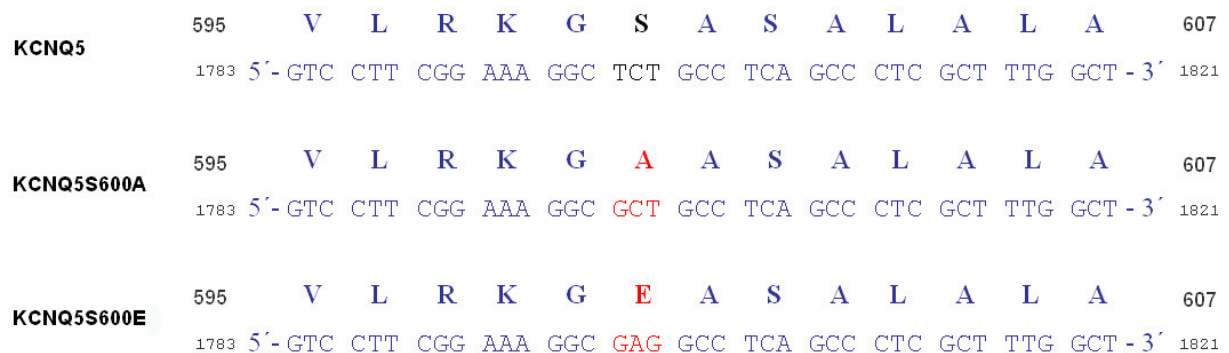
Aufgrund der diskreten Bande im Western Blot handelt es sich bei diesem detektierten 40kDa Signal möglicherweise um ein Abbauprodukt, wie es auch bei der Prozessierung durch Proteasen, beispielsweise den Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen ADAMs, im Wege der

Signaltransduktion entsteht (Maretzky et al., 2005). Weitere Untersuchungen sind daher für eine genaue Aussage über die Bedeutung und mögliche Funktion der im Western Blot identifizierten spezifischen Artefakte von KCNQ1 notwendig.

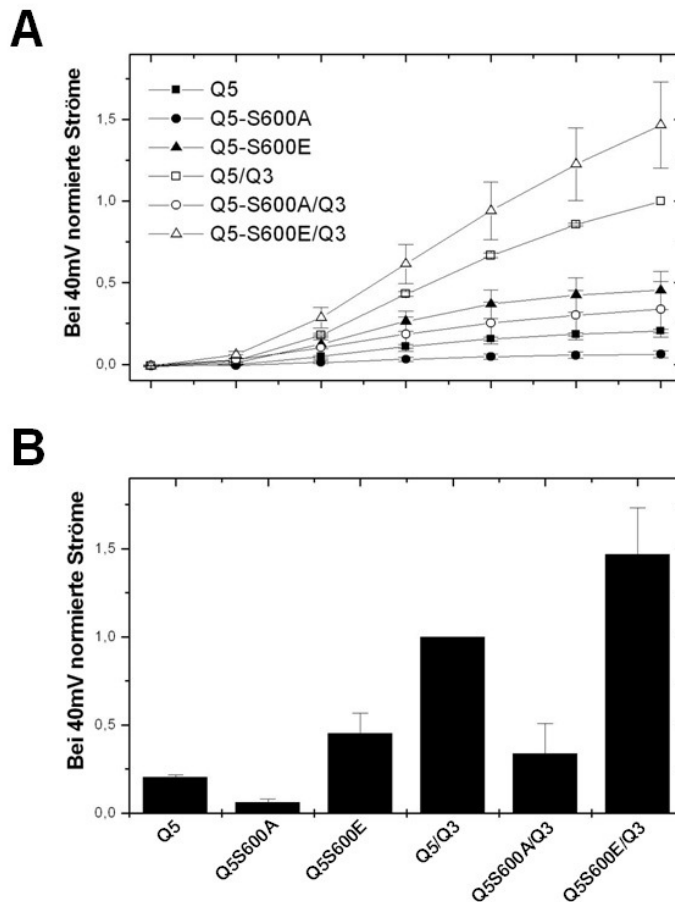
Insgesamt konnte für den HA markierten Kanal KCNQ1 jedoch keine N-Glykosylierung in transient transfizierten COS-7 Zellen nachgewiesen werden. Eine weitere Charakterisierung der Assemblierung von KCNQ2 und KCNQ3 mit Hilfe der N-glykosylierten Chimären von KCNQ1 mit der si-Domäne von KCNQ3 war daher nicht möglich.

### 3.1.11 Untersuchungen zur putativen Protein Kinase A (PKA) abhängigen Phosphorylierung von KCNQ5

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass der Bereich der si-Domäne mit den beiden für alle *KCNQ Untereinheiten* nachweisbaren TCC-Domänen TCC1 und TCC2 notwendig für die Assemblierung der verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten KCNQ1 bis KCNQ5 zu einem funktionellen tetrameren Kanal ist. Für die zuletzt von Schroeder et al., 2000 beschriebene KCNQ Untereinheit KCNQ5 konnte eine putative Protein Kinase A (PKA) abhängige Phosphorylierungsstelle an Position S600 identifiziert werden, die unmittelbar an die zweite TCC-Domäne von KCNQ5 angrenzt. Diese putative PKA abhängige Phosphorylierungsstelle könnte im Fall einer Phosphorylierung einen Einfluss auf die Assemblierung des homomeren Kanals von KCNQ5 oder sogar auf den heteromeren Kanal bestehend aus KCNQ3 und KCNQ5 ausüben. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden die zwei durch eine Punktmutation veränderten Kanäle KCNQ5-S600A und KCNQ5-S600E kloniert und anhand mit cRNA von KCNQ5, KCNQ5-S600A und KCNQ5-S600E injizierten *Xenopus* Oozyten elektrophysiologisch untersucht.



**Abbildung 3.25: Übersichtszeichnung über die in KCNQ5 untersuchten Punktmutanten S600A und S600E.** Gezeigt wird zum einen die Nukleotidsequenz, als auch die Aminosäuresequenz der unveränderten  $\alpha$ -Untereinheit von KCNQ5 im Vergleich zu den beiden Punktmutanten S600A und S600E. Die veränderten Bereiche, sowohl der Nukleotid- als auch der Aminosäuresequenz sind farblich hervorgehoben.

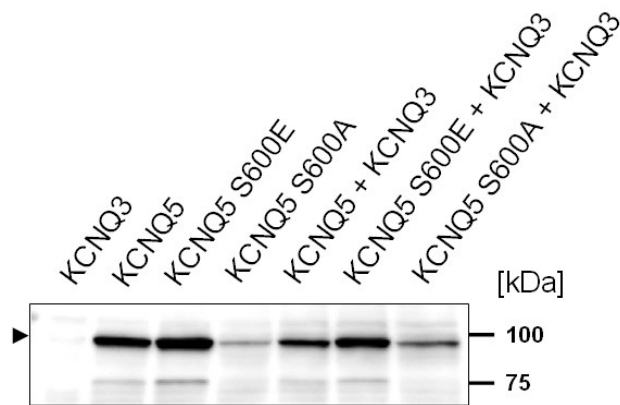


**Abbildung 3.26: Elektrophysiologische Untersuchungen der beiden Punktmutanten S600A und S600E von KCNQ5.** Abbildung (A) zeigt die gemessenen und bei 40mV normierten Ströme für KCNQ5 (Q5), und den beiden durch Punktmutation veränderten Kanaluntereinheiten S600A und S600E von KCNQ5, die entweder allein oder zusammen mit KCNQ3 (Q3) in *Xenopus* Oozyten injiziert wurden. (B) Überblick über die bei 40mV gemessenen Ströme von Q5, Q5S600A, Q5S600E, Q3/Q5, Q3/Q5S600A und Q3/Q5S600E in Form eines Balkendiagramms. Die gemessenen Werte wurden anhand des Wertes für Q3/Q5 normiert.

Der Austausch des Serins an Position S600 zu einem Alanin sollte durch das Entfernen der putativen Phosphorylierungsstelle zu einer Inhibierung einer eventuellen cAMP abhängigen Phosphorylierung führen. Die weitere Punktmutation KCNQ5-S600E diente aufgrund der an Position S600 eingefügten negativen Ladung des Glutamats der Nachahmung einer eventuellen Phosphorylierung durch eine cAMP abhängige Kinase. Die Abbildung 3.25 zeigt zum besseren Verständnis sowohl die Nukleotid- als auch die Aminosäureabfolge für die beiden eingefügten Punktmutationen S600A und S600E von KCNQ5.

Die Abbildung 3.26 fasst die Ergebnisse für die mit cRNA von KCNQ5, KCNQ5-S600A und KCNQ5-S600E, oder gemeinsam mit KCNQ3 injizierten *Xenopus* Oozyten zusammen. Abbildung 3.26 (A) zeigt die Strom-/Spannungskurven für die in *Xenopus* Oozyten allein oder zusammen mit KCNQ3 injizierten, veränderten und unveränderten Kanäle von KCNQ5. Die größten Ströme ließen sich für den entweder allein, oder mit KCNQ3 in *Xenopus* Oozyten





**Abbildung 3.27: Western Blot Analyse der zuvor elektrophysiologisch untersuchten Punktmutanten S600A und S600E von KCNQ5.** Membranpräparationen der in *Xenopus* Oozyten zusammen mit und ohne KCNQ3 injizierten Punktmutanten S600A und S600E von KCNQ5 wurden durch eine SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese aufgetrennt und durch eine Western Blot Analyse mit dem Anti KCNQ5 Antikörper von Santa Cruz (Santa Cruz, USA) charakterisiert. Der Pfeil kennzeichnet die für KCNQ5 beschriebene 99kDa große monomere  $\alpha$ -Untereinheit (Schroeder et al., 2000).

injizierten Kanal KCNQ5-S600E nachweisen. In mit cRNA von KCNQ5-S600A entweder allein oder gemeinsam mit KCNQ3 injizierte *Xenopus* Oozyten wurden die geringsten Ströme gemessen. Der unveränderte Kanal von KCNQ5 zeigte Ströme, die in ihrer Amplitude niedriger als die von KCNQ5-S600E aber größer als die von KCNQ5-S600A waren. Dieselbe Tendenz ließ sich für den heteromeren Kanal von KCNQ3 und KCNQ5 beobachten, wobei die Ströme von KCNQ3 und KCNQ5 geringer im Vergleich zu den gemessenen Strömen von KCNQ5-S600E und KCNQ3, hingegen deutlich verstärkt zu den gemessenen Strömen von KCNQ5-S600A und KCNQ3 waren. Die Abbildung 3.26 (B) verdeutlicht die gemessenen Ergebnisse anhand der bei einer Spannung von 40mV normierten Werte für den heteromeren Kanal von KCNQ3 und KCNQ5 in Form eines Balkendiagramms. Im Anschluss zu den elektrophysiologischen Messungen wurden die durch die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode untersuchten und mit cRNA injizierten *Xenopus* Oozyten für eine darauffolgende Western Blot Analyse präpariert (Abbildung 3.27).

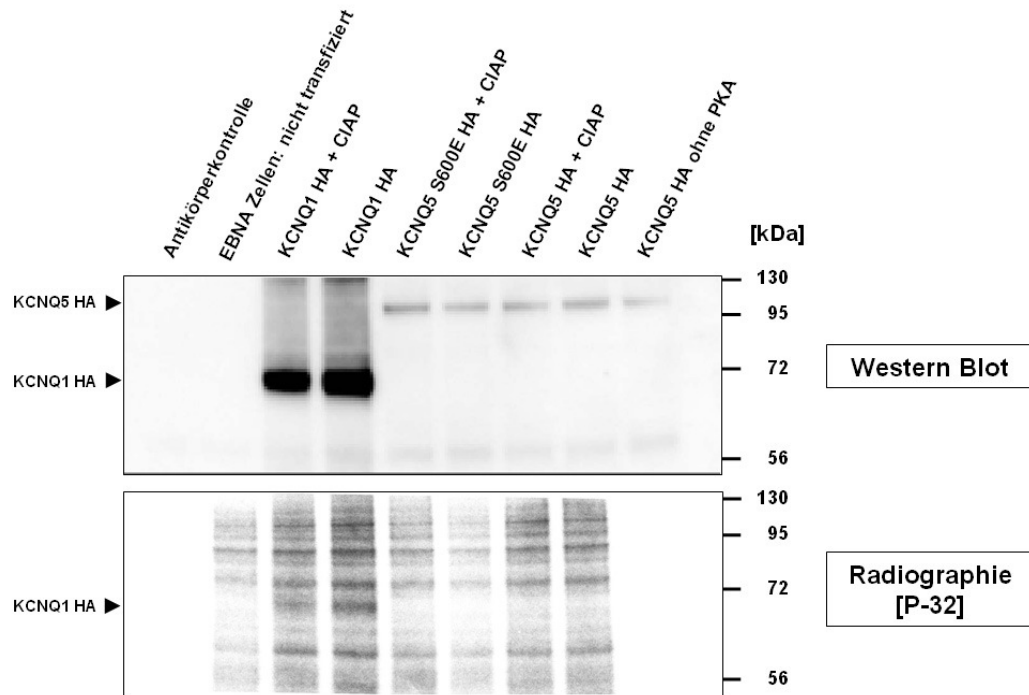
Als Kontrolle für den verwendeten Antikörper gegen KCNQ5 dienten nur mit cRNA von KCNQ3 injizierte *Xenopus* Oozyten. Der Antikörper erkannte KCNQ5 und die beiden durch Punktmutationen veränderten Kanäle KCNQ5-S600A und KCNQ5-S600E sowohl allein, als auch zusammen mit KCNQ3. Die Stärke der im Western Blot detektierten Signale variierte zum Teil erheblich. *Xenopus* Oozyten, die entweder allein nur mit cRNA von KCNQ5-S600A oder mit den cRNAs von KCNQ5-S600A und KCNQ3 injiziert wurden, zeigten im Western Blot deutlich schwächere Signale, als für die mit cRNA von KCNQ5 allein oder gemeinsam mit KCNQ5 und KCNQ3 injizierte *Xenopus* Oozyten. Hingegen war das Signal für mit cRNA von KCNQ5-S600E allein oder zusammen mit cRNA von KCNQ5-S600E und KCNQ3

injizierte *Xenopus* Oozyten gleich oder nur leicht verstärkt im Vergleich zu den im Western Blot detektierten Signalen der mit cRNA von KCNQ5 allein oder zusammen mit KCNQ5 und KCNQ3 injizierten *Xenopus* Oozyten. In wiederholt durchgeführten Experimenten war die Stärke der beobachteten Signale im Western Blot für alle drei untersuchten Kanäle KCNQ5, KCNQ5S600A und KCNQS600E jedoch vergleichbar, einzig die Werte für die elektrophysiologischen Untersuchungen der mit KCNQ5, KCNQ5S600A und KCNQS600E injizierten *Xenopus* Oozyten variierten in der bereits beobachteten Art und Weise.

Insgesamt führte eine Veränderung der putativen Phosphorylierungsstelle an Position S600 zu unterschiedlich starken Strömen bei elektrophysiologischen Experimenten unter Verwendung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode in mit cRNA injizierten *Xenopus* Oozyten für die untersuchten Kanäle KCNQ5-S600A und KCNQ5-S600E im Vergleich zum unveränderten Kanal von KCNQ5.

### **3.1.12 *In vitro* Phosphorylierungsexperimente zur Protein Kinase A (PKA) abhängigen Modifikation von KCNQ5**

Zur Aufklärung des beobachteten Sachverhaltes wurde versucht eine mögliche Phosphorylierung von KCNQ5 durch *in vitro* Phosphorylierungsexperimente mit der Protein Kinase A unter Verwendung von P-32  $\gamma$ -ATP nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden EBNA Zellen transient mit den carboxyterminal HA markierten KCNQ Kanälen KCNQ1HA, KCNQ5HA und KCNQ5-S600EHA transfiziert. Die Abbildung 3.28 zeigt die Western Blot Analyse für die in EBNA überexprimierten und anschließend präparierten Kanäle KCNQ1HA, KCNQ5HA und KCNQ5-S600EHA. Die Charakterisierung erfolgte unter Verwendung des 3F10 Antikörpers gegen die Hämagglutinin Erkennungssequenz. Mit KCNQ1HA transient transfizierte EBNA Zellen ergaben ein positives Signal bei 65kDa bis 70kDa, wie es auch schon von Dilly et al., 2004 gezeigt wurde. Mit KCNQ5 oder KCNQ5-S600E transfizierte EBNA Zellen zeigten ebenfalls ein positives Signal bei ungefähr 100kDa. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte EBNA Zellen. In wiederholten Western Blot Analysen zeigte sich, dass im Vergleich zu den mit KCNQ5HA oder KCNQ5-S600EHA transfizierten EBNA Zellen, die mit lediglich KCNQ1HA transfizierten EBNA Zellen deutlich mehr des zu exprimierenden Proteins synthetisierten. Diese Beobachtung stimmt mit den bereits für KCNQ3 und KCNQ1 beobachteten unterschiedlich starken Signalen im Western Blot überein (Abbildung 3.11) und führt zu der Vermutung, dass KCNQ1 insgesamt stärker als die übrigen KCNQ Kanäle exprimiert wird.



**Abbildung 3.28: Experimente zur putativen Phosphorylierung von KCNQ5.** Membranpräparationen transient mit KCNQ1HA, KCNQ5HA und KCNQ5S600EHA transfizierter EBNA Zellen wurden mit alkalischer Phosphatase aus dem Darm von Kälbern (CIAP) behandelt und darauf *in vitro* mit radioaktivem P-32  $\gamma$ -ATP phosphoryliert. Die Charakterisierung erfolgte durch eine anschließende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse mit dem monoklonalen 3F10 Antikörper (Roche, Mannheim, Deutschland). Zusätzlich wurden nicht mit CIAP behandelte aber dennoch mit P-32  $\gamma$ -ATP *in vitro* phosphorylierte Proben aufgetragen. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Protein Kinase A (PKA) abhängige Phosphorylierung diente ein Ansatz ohne PKA. Die Pfeile zeigen einmal die im Western Blot detektierten Signale für die HA markierten Proteine von KCNQ1HA, KCNQ5 und KCNQ5S600EHA. Die Autoradiographie ergab nur ein Signal für das *in vitro* phosphorylierte KCNQ1HA.

Das Signal für KCNQ1HA war stets stärker als das Signal für KCNQ5HA oder KCNQ5-S600EHA, obwohl gleiche Mengen an präpariertem Membranprotein für die Western Blot Analyse verwendet wurde. Für die *in vitro* Phosphorylierung von KCNQ1HA, KCNQ5HA und KCNQ5-S600E wurden die präparierten Membranproteine zusätzlich mit 3F10 Antikörper immunpräzipitiert, um den Anteil der zu untersuchenden Proteine im Vergleich zu den übrigen Membranproteinen der EBNA Zellen zu erhöhen. Zusätzlich wurden Doppelansätze verwendet. Jeweils eine Probe wurde mit alkalischer Phosphatase aus dem Darm von Kälbern behandelt, um sicherzustellen, dass genügend dephosphoryliertes Protein für die *in vitro* Phosphorylierung zur Verfügung steht. Als weitere Kontrollen dienten entweder Versuchsansätze ohne Membranprotein nur mit Kinasepuffer und 3F10 Antikörper oder Membranpräparate von KCNQ5, die für die *in vitro* Phosphorylierung mit P-32  $\gamma$ -ATP, aber ohne PKA behandelt wurden.

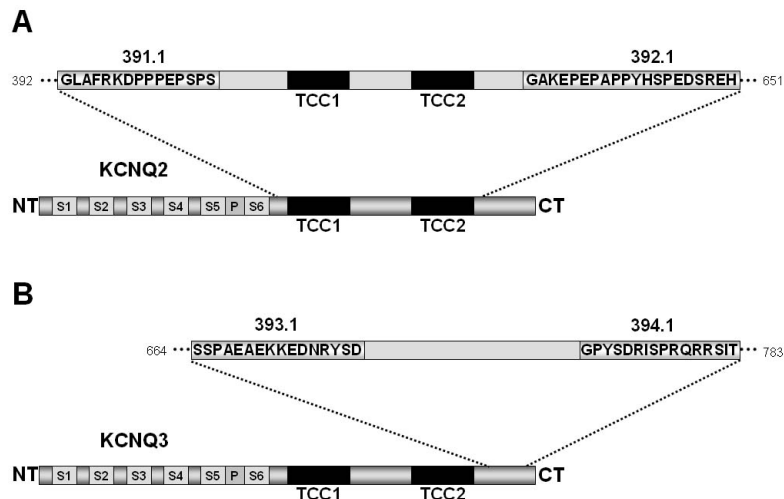
Die Abbildung 3.28 zeigt neben der Western Blot Analyse für die untersuchten Kanäle KCNQ1HA, KCNQ5HA und KCNQ5-S600EHA auch das Ergebnis für die *in vitro*

Phosphorylierung der mit P-32  $\gamma$ -ATP und PKA behandelten KCNQ Kanäle. Für das in EBNA Zellen sehr stark überexprimierte KCNQ1HA konnte durch Autoradiographie mit P-32 eine *in vitro* Phosphorylierung nachgewiesen werden. Die Stärke des radioaktiven Signals für die zuvor mit alkalischer Phosphatase aus dem Darm von Rindern (CIAP) behandelte Probe von KCNQ1HA unterschied sich dabei nicht von der nicht mit CIAP behandelten Probe. Für die beiden ebenfalls in EBNA Zellen überexprimierten KCNQ Kanäle KCNQ5HA und KCNQ5-S600E konnte kein Signal nach Behandlung mit P-32 nachgewiesen werden. Möglicherweise liegt dies aber an der Versuchsdurchführung, da auch eine zusätzlich durchgeführte Präzipitation von KCNQ5 nicht zu einer gewünschten Zunahme der Signalstärke im Western Blot führte. Das radioaktive Signal für KCNQ1 ist auch nur schwach zu sehen, obwohl KCNQ1 sehr viel stärkere Signale im Western Blot zeigt. Es ist daher wahrscheinlich, dass eine Phosphorylierung von KCNQ5 aufgrund der Nachweisgrenze nicht dokumentiert werden konnte, oder aber KCNQ5 generell nicht PKA abhängig phosphoryliert wird.

### **3.2 Charakterisierung polyklonaler Antikörper gegen KCNQ2 und KCNQ3 aus Kaninchen**

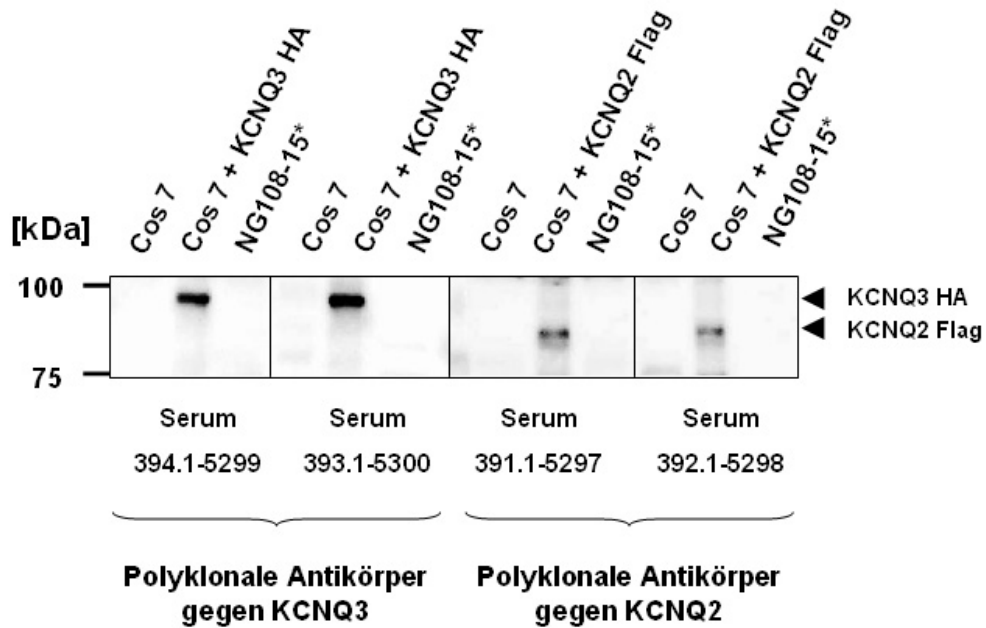
Die Charakterisierung der meisten transient in COS-7 oder auch EBNA Zellen transfizierten KCNQ Kanäle erfolgte hauptsächlich durch amino- oder auch carboxyterminal angefügte HA oder FLAG Erkennungssequenzen. Durch das Anfügen dieser Erkennungssequenzen kann aber unter Umständen die Eigenschaft und Funktionsweise der zu untersuchenden Proteine beeinträchtigt werden. Daher erfolgten in der Regel die weiteren physiologischen Untersuchungen von mit cRNA von KCNQ Kanälen injizierten *Xenopus laevis* Oozyten ohne HA oder FLAG Erkennungssequenz. Zudem sind gut funktionierende Antikörper unumgänglich für die Untersuchung der Heteromerisierung von KCNQ2 und KCNQ3 aus nativen Geweben, beispielsweise dem Gehirn. Aus diesem Grund und zur zusätzlichen Verifizierung von Western Blot Analysen wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt vier Antikörper, jeweils zwei gegen KCNQ2 und zwei gegen KCNQ3 entwickelt.

Die Abbildung 3.29 gibt einen Überblick der Aminosäureabfolge für die Epitope der in Kaninchen produzierten polyklonalen Antikörper 391.1 und 392.1 gegen KCNQ2, sowie für die Epitope der beiden weiteren polyklonalen Antikörper 393.1 und 394.1 gegen KCNQ3. Das Epitop von 391.1 gegen KCNQ2 befindet sich hinter der sechsten Transmembrandomäne



**Abbildung 3.29:** Schematische Übersichtsskizze für die Epitope der in Kaninchen produzierten polyklonalen Antikörper (A) 391.1 und 392.1 gegen das humane KCNQ2 und der weiteren polyklonalen Antikörper (B) 393.1 und 394.1 gegen das humane KCNQ3. (A) Das Epitop für 391.1 mit der Aminosäureabfolge GLAFRKDPPEPSPS befindet sich stromaufwärts vor der ersten TCC-Domäne TCC1, das Epitop des weiteren polyklonalen Antikörpers 392.1 der Aminosäureabfolge GAKEPEPAPPYHSPEDSREH carboxyterminal hinter der zweiten TCC-Domäne TCC2 der humanen  $\alpha$ -Untereinheit von KCNQ2. (B) Die Epitope der beiden polyklonalen Antikörper 393.1 und 394.1 der Aminosäureabfolge SSPAEAEKKEDNRYSD und GPYSDRISPRQRRSIT gegen die  $\alpha$ -Untereinheit des humanen KCNQ3 befinden sich jeweils stromabwärts der zweiten TCC-Domäne TCC2 von KCNQ3.

S6 und vor der ersten TCC-Domäne TCC1 von KCNQ2, wohingegen sich das Epitop des Antikörpers 392.1 gegen KCNQ2 hinter der zweiten TCC-Domäne TCC2 von KCNQ2 befindet. Die Epitope der weiteren polyklonalen Antikörper 393.1 und 394.1 gegen KCNQ3 befinden sich dagegen beide im carboxyterminalen Bereich von KCNQ3 hinter dessen S6-Domäne. Für die Charakterisierung der beiden polyklonalen Antikörper 391.1 und 392.1 gegen KCNQ2 und der beiden weiteren polyklonalen Antikörper 393.1 und 394.1 gegen KCNQ3 wurden COS-7 Zellen transient mit KCNQ2FLAG oder KCNQ3HA transfiziert. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte COS-7 Zellen. In der anschließenden Western Blot Analyse wurden die präparierten Membranlysate der sowohl transfizierten als auch nicht transfizierten COS-7 Zellen mit einer 1:200 Verdünnung der gereinigten polyklonalen Antikörper behandelt und unter Verwendung eines mit Meerrettichperoxidase gekoppelten sekundären Antikörpers entwickelt. Die Abbildung 3.30 gibt einen Überblick über die durch Western Blot Analyse erzielten Ergebnisse für die vier polyklonalen Antikörper aus Kaninchen gegen KCNQ2 und KCNQ3. Zur Untersuchung der Spezifität der gereinigten polyklonalen Antikörper und zur Überprüfung der Reaktivität gegenüber endogen exprimierten KCNQ Kanälen wurden des weiteren Membranpräparate der neuronalen NG108-15 Zellen für die Western Blot Analyse verwendet. In elektrophysiologischen Untersuchungen konnten für

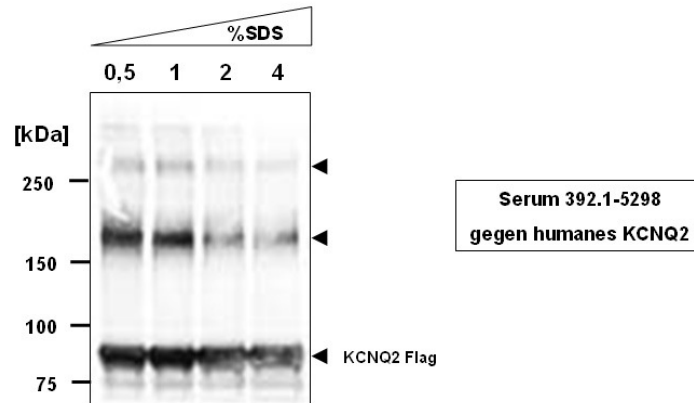


**Abbildung 3.30: Western Blot Analyse der polyklonalen Antikörper 391.1 und 392.1 gegen das humane KCNQ2FLAG, sowie der polyklonalen Antikörper 393.1 und 394.1 gegen das humane KCNQ3HA anhand von transient mit KCNQ2FLAG oder KCNQ3HA transfizierten COS-7 Zellen.** Als Kontrolle dienten Membranpräparationen nicht transient mit KCNQ2FLAG oder KCNQ3HA transfizierter COS-7 Zellen. Die in COS-7 Zellen überexprimierte  $\alpha$ -Untereinheit von KCNQ2 (88kDa) wird von den polyklonalen Antikörpern 391.1 und 392.1 erkannt. Auch die weitere in COS-7 Zellen überexprimierte  $\alpha$ -Untereinheit KCNQ3 97(kDa) wird von den polyklonalen Antikörpern 393.1 und 394.1 erkannt. \*Die in elektrophysiologischen Experimenten für die neuronale Zelllinie NG108-15 beschriebenen und für den im Gehirn vorkommenden M-Strom verantwortlichen Untereinheiten KCNQ2 und KCNQ3 lassen sich jedoch nicht mit den untersuchten Antikörpern 391.1, 392.1, 393.1 und 394.1 in NG108-15 Membranpräparationen nachweisen. Die Nummern neben der Bezeichnung der Antikörper 391.1, 392.1, 393.1 und 394.1 5297, 5298, 5299 und 5300 sind eine Bezeichnung für die unterschiedlichen Kaninchen Individuen, die für die Produktion der Antikörperseren verwendet wurden.

NG108-15 Zellen Ströme ähnlich dem M-Strom von Neuronen zugeordnet werden, was zu der Vermutung führt, dass sowohl KCNQ2, als auch KCNQ3 in NG108-15 Zellen ausgebildet werden (Meves et al., 1999; Selyanko et al., 1999).

Sowohl der Antikörper 391.1, als auch der zweite Antikörper 392.1 erkennen das transient in COS-7 Zellen transfizierte und ungefähr 90kDa große KCNQ2FLAG. Jedoch kann kein endogenes Protein von KCNQ2 in Membranpräparaten von NG108-15 Zellen von den beiden untersuchten polyklonalen Antikörpern 391.1 und 392.1 erkannt werden. Auch die beiden polyklonalen Antikörper 393.1 und 394.1 gegen KCNQ3 erkennen das transient in COS-7 Zellen transfizierte und ungefähr 100kDa große KCNQ3HA, aber nicht das endogene Protein von KCNQ3 in Membranpräparaten von NG108-15 Zellen.

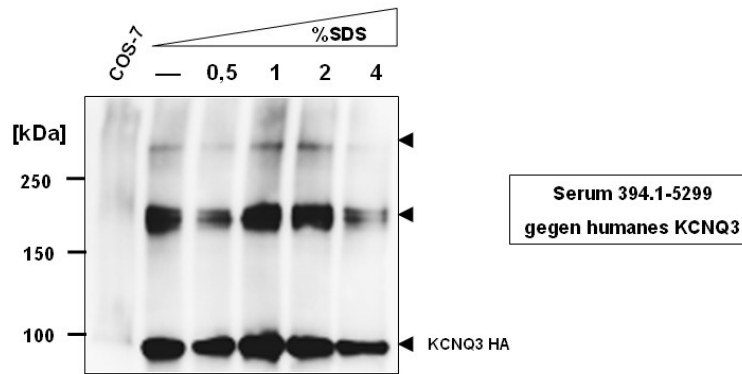
Der polyklonale Antikörper 392.1 gegen KCNQ2 erkennt aber nicht nur das Monomer von KCNQ2FLAG. In Western Blot Analysen konnten weitere Signale für KCNQ2 nachgewiesen werden, die aufgrund ihrer molekularbiologischen Größe möglicherweise dem Dimer und



**Abbildung 3.31: Western Blot Analyse zur Charakterisierung der Spezifität des polyklonalen Antikörpers 392.1 gegen die humane  $\alpha$ -Untereinheit von KCNQ2.** Eine Membranpräparation transient mit KCNQ2FLAG transfizierter COS-7 Zellen wurde mit unterschiedlicher SDS-Konzentration an reduzierendem Probenauftragspuffer für 30min bei 37°C inkubiert und anschließend durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert. Die Charakterisierung erfolgte durch anschließende Western Blot Analyse mit dem gereinigten polyklonalen Serum 392.1 gegen das humane KCNQ2. Das Monomer von KCNQ2 besitzt eine Größe von 88kDa. Daneben wurden weitere durch Pfeile markierte Signale beobachtet, die aufgrund ihrer molekularbiologischen Größe möglicherweise dem Dimer und Trimer von KCNQ2 zuzuordnen sind. Mit steigender SDS-Konzentration im Auftragspuffer nimmt die Stärke der Signale für das putative Dimer und Tetramer von KCNQ2 ab, das Signal für das Monomer von KCNQ2 hingegen wird leicht verstärkt.

Trimer der FLAG markierten KCNQ Untereinheit KCNQ2 zuzuordnen sind. Aus diesem Grund wurde das präparierte Membranprotein von KCNQ2 mit unterschiedlich stark SDS-haltigem Auftragspuffer versehen. Die eingesetzten Auftragspuffer enthielten ebenfalls die reduzierende Substanz Dithiothreitol, kurz DTT, in einer Konzentration von 100mM. Die Abbildung 3.31 zeigt Membranpräparate von mit KCNQ2FLAG transfizierten COS-7 Zellen, die mit unterschiedlich stark SDS-haltigen Auftragspuffern für 30min bei 37°C denaturiert wurden. Bei einer SDS-Konzentration von nur 0,5% im verwendeten Auftragspuffer ist nach einer halbstündigen Erwärmung der Probe auf 37°C für die Western Blot Analyse ein Signal für das Monomer, sowie das putative Dimer und Trimer von KCNQ2FLAG nachweisbar. Bei einer SDS-Konzentration von 4% im Auftragspuffer wird das Signal für das Monomer von KCNQ2FLAG bei ungefähr 90kDa stärker, die Signale für das putative Dimer (180kDa) und Trimer von KCNQ2FLAG (270kDa) werden hingegen deutlich schwächer im Vergleich zu den mit 0,5% SDS behandelten und mit dem polyklonalen Antikörper 392.1 gegen KCNQ2 detektierten Proben.

Des weiteren wurden Membranpräparate für mit KCNQ3HA transient transfizierten COS-7 Zellen ebenfalls durch zusätzliche Western Blot Analyse mit unterschiedlich stark SDS-konzentriertem Probenauftragspuffer behandelt, um den polyklonalen Antikörper 394.1 gegen KCNQ3 genauer zu charakterisieren. Die Abbildung 3.32 zeigt das Ergebnis für die Western Blot Analyse der mit KCNQ3 transient transfizierten COS-7 Zellen und mit dem polyklonalen



**Abbildung 3.32: Western Blot Analyse zur Charakterisierung der Spezifität des polyklonalen Antikörpers 394.1 gegen die humane  $\alpha$ -Untereinheit von KCNQ3.** Membranpräparationen transient mit KCNQ3HA transfizierter COS-7 Zellen wurden mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen in reduzierendem Probenauftragspuffer für 30min bei 37°C inkubiert und anschließend durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert. Die Charakterisierung erfolgte durch darauffolgende Western Blot Analyse mit dem gereinigten polyklonalen Serum 394.1 gegen das humane KCNQ3. Das Monomer von KCNQ3 besitzt eine Größe von 97kDa. Daneben wurden weitere durch Pfeile markierte Signale beobachtet, die aufgrund ihrer molekularbiologischen Größe möglicherweise dem Dimer und Trimer von KCNQ3HA zuzuordnen sind. Bei einer SDS- Konzentration von 4% im Auftragspuffer nimmt die Stärke der Signale für das putative Dimer und Trimer von KCNQ3HA ab.

Antikörper 394.1 gegen KCNQ3 charakterisierten Membranpräparate. Der polyklonale Antikörper 394.1 erkennt ein Signal bei ungefähr 100kDa, das dem Monomer von KCNQ3HA zuzuordnen ist. Daneben werden zwei weitere Signale von dem 394.1 Antikörper gegen KCNQ3 erkannt, die bei ungefähr 200kDa und 300kDa liegen und höchst wahrscheinlich dem Dimer und Trimer von KCNQ3HA entsprechen. Ein Signal für das putative Tetramer von KCNQ3HA konnte nicht detektiert werden. Als zusätzliche Kontrolle wurden Membranpräparate von nicht transfizierten COS-7 Zellen für die Western Blot Analyse verwendet. Der polyklonale Antikörper 394.1 gegen KCNQ3 erkennt für die entsprechende Spur auch kein Signal für Proteinkomplexe von KCNQ3HA. Zur genaueren Charakterisierung des polyklonalen Antikörpers 394.1 wurden die mit KCNQ3HA transient transfizierten und präparierten Membranlysate von COS-7 Zellen ebenfalls mit vier unterschiedlich stark SDS-haltigen Probenauftragspuffern versehen und eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dienten daneben Membranpräparate von transient KCNQ3HA transfizierten und nicht mit SDS behandelten COS-7 Zellen.

Aus der Abbildung 3.32 ist ersichtlich, dass bei einer SDS-Konzentration von 4% das Signal für das putative Trimer verschwindet. Die Stärke für das mit dem polyklonalen Antikörper 394.1 detektierte Signal für das putative Dimer von KCNQ3HA nimmt dabei ebenfalls erheblich ab, so dass es sich bei dem beobachteten Signal höchstwahrscheinlich tatsächlich um das Dimer von KCNQ3HA handelt.

Insgesamt ergeben die Versuche zur Charakterisierung der polyklonalen Antikörper 391.1 und 392.1 gegen KCNQ2, sowie der weiteren polyklonalen Antikörper 393.1 und 394.1 gegen

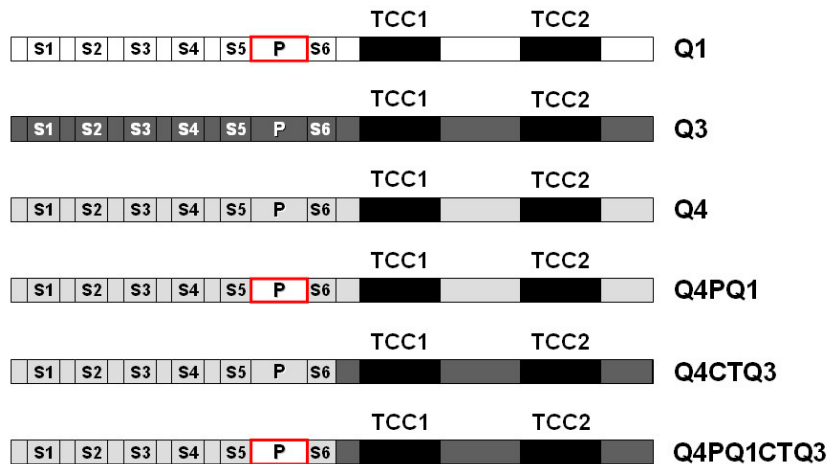


KCNQ3, dass in COS-7 Zellen überexprimiertes Protein von KCNQ2 und KCNQ3 sehr spezifisch erkannt wird. Mit den untersuchten Antikörpern kann auch eine mögliche Multimerisierung von Proteinen nachgewiesen werden, wobei die endogen exprimierte Untereinheit von KCNQ2 und KCNQ3 in nativen Gewebe, beispielsweise in NG108-15 Zellen nicht erkannt werden konnte. Es konnten ebenfalls keine Signale für KCNQ2 und KCNQ3 für Membranpräparate aus dem Gehirn von Mäusen in zusätzlich durchgeführten Western Blot Analysen beobachtet werden (hier nicht gezeigt).

### **3.3 Einfluss der Porenregion von KCNQ1 (PQ1) und des C-Terminus von KCNQ3 (CTQ3) auf die resultierenden Ströme von KCNQ2, KCNQ4 und KCNQ5**

#### **3.3.1 Untersuchungen zur stromverstärkenden Wirkung der Porenregion von KCNQ1 (PQ1) und des C-Terminus von KCNQ3 anhand von KCNQ4 Chimären**

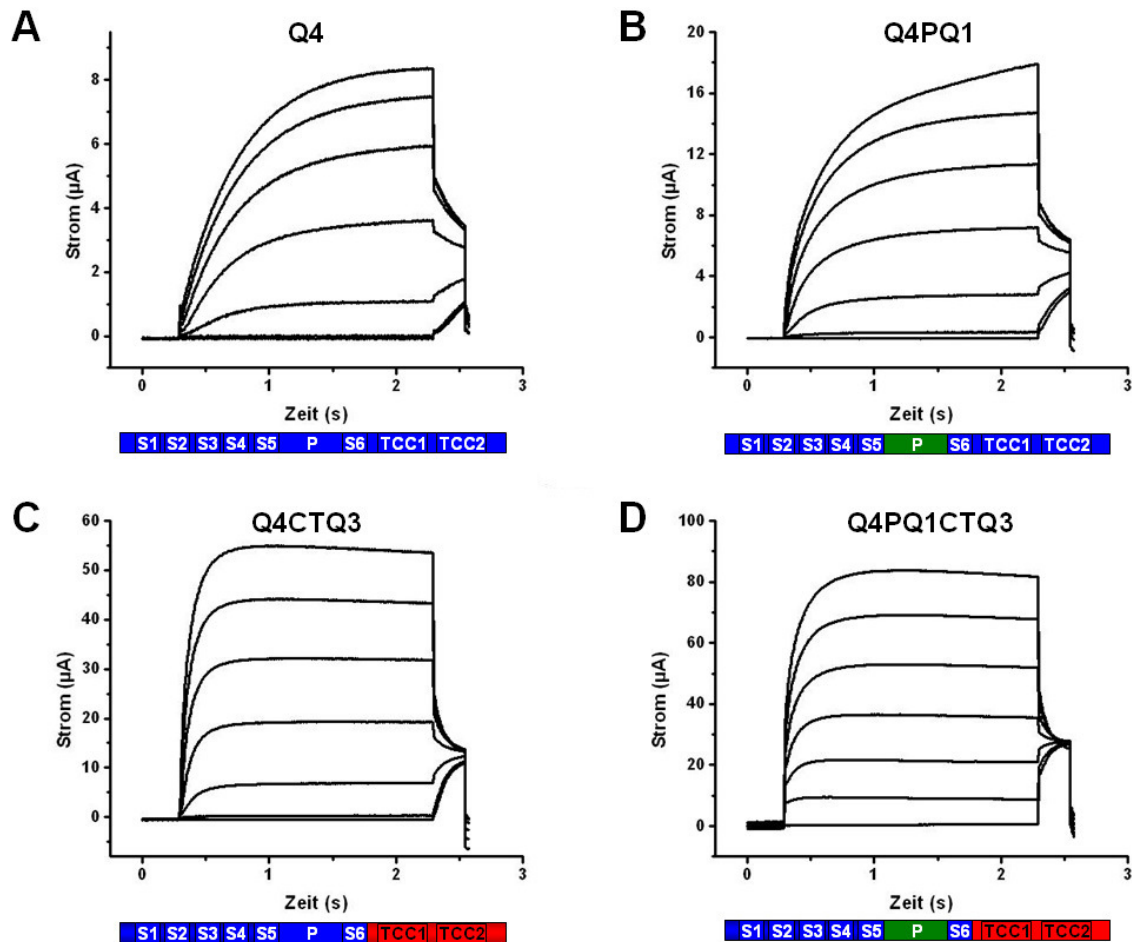
Untersuchungen zur Interaktion von KCNQ3 ergaben, dass der C-Terminus von KCNQ3 für die Interaktion mit KCNQ2 notwendig ist, und dass die für die Interaktion von KCNQ Kanälen wichtigen Bereiche nicht wie bei Kanälen der *Shaker*-Familie mit der sogenannten T1 Region aminoterminal gelegen sind (Schmitt et al., 2000; Schwake et al., 2000; Schwake et al., 2003). Maljevic et al. konstruierten 2003 eine Chimäre von KCNQ1 mit dem carboxyterminalen Bereich von KCNQ3, die als Q1CTQ3 bezeichnet wurde. Obwohl KCNQ3 für sich allein nur Ströme mit geringer Amplitude aufweist, führt eine Koinjektion von KCNQ2 und KCNQ3, oder von KCNQ2 und der Chimäre Q1CTQ3 cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten zu einer Zunahme des gemessenen Stroms um den Faktor fünfzehn bis dreißig für den resultierenden heteromeren *KCNQ Kanal* im Vergleich zu den homomeren Kanälen von KCNQ2 oder KCNQ3 (Maljevic et al., 2003). Aber auch für sich allein in *Xenopus* Oozyten injiziert, sind die gemessenen Ströme für die Chimäre von KCNQ1CTQ3 zehnfach erhöht, im Vergleich zu den gemessenen Strömen für den homomeren *KCNQ Kanal* von KCNQ1. Zur genaueren Untersuchung über den stimulierenden Effekt des carboxyterminalen Bereiches von KCNQ3 auf die in *Xenopus* Oozyten gemessenen Ströme wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Chimäre von KCNQ4 und KCNQ3 konstruiert, bei der der vordere Bereich



**Abbildung 3.33: Schematische Übersicht über verschiedene Chimären von KCNQ4 (Q4) mit der Porenregion von KCNQ1 (PQ1) oder dem carboxyterminalen Bereich von KCNQ3 (CTQ3).** Die Porenregion umfasst den Bereich zwischen den beiden Transmembrandomänen S5 und S6 von KCNQ1 von Position KCNQ1-D286 bis einschließlich KCNQ1-Q357, nebst der Turret Domäne mit der N-glykosydischen Bindestelle an Position KCNQ1-N289. Der 503 Aminosäuren große carboxyterminale Bereich von KCNQ3(CTQ3) beginnt direkt hinter der sechsten Transmembrandomäne von KCNQ3 an Position KCNQ3-E369 und enthält die si-Domäne von KCNQ3 mit den beiden hochgradig helikal spiralisierten TCC-Domänen TCC1 und TCC2. Die Chimäre KCNQ4PQ1CTQ3 enthält sowohl die 36 Aminosäuren große Porenregion von KCNQ1 (PQ1), die zur besseren Verdeutlichung rot umrandet ist, als auch der C-Terminus von KCNQ3 (CTQ3) mit dem Proteinrückgrat von KCNQ4. Der Austausch der Porenregion von KCNQ4 gegen die Porenregion von KCNQ1 (PQ1) erfolgte für KCNQ4 von Position KCNQ4-D262 bis einschließlich KCNQ4-H292. Der Austausch des C-Terminus von KCNQ4 gegen den carboxyterminalen Bereich von KCNQ3 (CTQ3) erfolgte von Position KCNQ4-E336.

bis einschließlich zur sechsten Transmembrandomäne (S1 bis S6) der Sequenz von KCNQ4 entsprach und der C-Terminus von KCNQ4 ab Position KCNQ4-E336 gegen den C-Terminus von KCNQ3 ausgetauscht wurde. Die Ströme der konstruierten Chimäre KCNQ4CTQ3 wurden mit dem Strom von KCNQ4 verglichen.

Gleichzeitig erfolgte die Untersuchung über die stimulierende Wirkung für Chimären mit der Turret Domäne von KCNQ1 und der N-Glykosylierungsseite an Position KCNQ1-N289 auf die Amplitude des resultierenden Stroms. Schenzer et al. konnten 2005 für Chimären von KCNQ3 mit der Porenregion von KCNQ1, beispielsweise KCNQ3(S5-P-S6;Q1) und KCNQ3(TD;Q1), in Experimenten mit injizierten *Xenopus* Oozyten zeigen, dass das Einfügen der Porenregion von KCNQ1 (PQ1) mit der darin befindlichen Turret Domäne zu größeren Strömen im Vergleich zu nur mit KCNQ3 injizierten *Xenopus* Oozyten führt, und dass dieser beobachtete Effekt möglicherweise mit einer ebenfalls erhöhten Oberflächenexpression der Chimäre einhergeht. Zur Untersuchung dieses beobachteten Phänomens wurden weitere Chimären konstruiert, bei denen die Porenregion von KCNQ1 gegen die Porenregion der weiteren KCNQ Kanäle KCNQ2, KCNQ4 und KCNQ5 ausgetauscht und die als KCNQ2-(PQ1), KCNQ4(PQ1) und KCNQ5(PQ1) bezeichnet wurden. Die Abbildung 3.33 gibt einen Überblick über die zuerst für KCNQ4 konstruierten Chimären. Die Chimäre von KCNQ4,

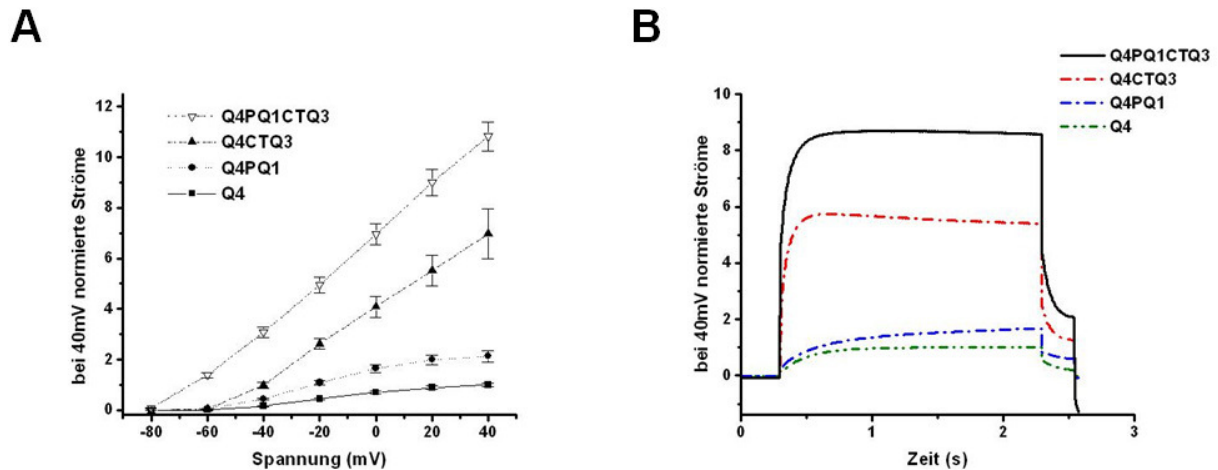


**Abbildung 3.34: Übersicht über die für die Chimären Q4PQ1, Q4CTQ3 und Q4PQ1CTQ3 gemessenen Ströme.** cRNAs von KCNQ4 (Q4), Q4PQ1, Q4CTQ3 und Q4PQ1CTQ3 wurden in *Xenopus* Oozyten injiziert. Nach einem Zeitraum von drei bis fünf Tagen wurden die injizierten *Xenopus* Oozyten elektrophysiologisch untersucht. Die Auswertung erfolgte anhand des Computerprogramms pCLAMP Version 9.2.0.09 (Axon Instruments, Inc., USA) an einem IBM kompatiblen Computer. Zusätzlich befindet sich unterhalb der Stromkurven eine schematische Darstellung für die untersuchten Kanäle. Das Proteinrückgrat von KCNQ4 ist in blau abgebildet. Die Poreregion von KCNQ1 wurde zur besseren Übersicht grün markiert und der C-Terminus von KCNQ3 ist in rot dargestellt.

KCNQ4(PQ1)CTQ3, besaß sowohl die Porenregion von KCNQ1 (PQ1), als auch den carboxyterminalen Bereich von KCNQ3.

Die gemessenen Stromkurven zeigen für den homotetrameren Kanal von KCNQ4(PQ1) deutlich verstärkte Ströme im Vergleich zum homotetrameren Kanal von KCNQ4. Auch die nur mit cRNA von KCNQ4CTQ3 injizierten *Xenopus* Oozyten zeigten größere Ströme im Vergleich zu nur mit cRNA von KCNQ4 injizierten *Xenopus* Oozyten. Ein Vergleich der beiden Ströme für die Chimären Q4TDQ1 und Q4CTQ3 ergab um den Faktor drei verstärkte Ströme für nur mit cRNA von Q4CTQ3 injizierte *Xenopus* Oozyten im Vergleich zu nur mit cRNA von Q4TDQ1 injizierte Oozyten.

Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch der Porenregion von KCNQ4 gegen die Porenregion von KCNQ1 analog zu den Beobachtungen von Schenzer et al., 2005 zu eben-

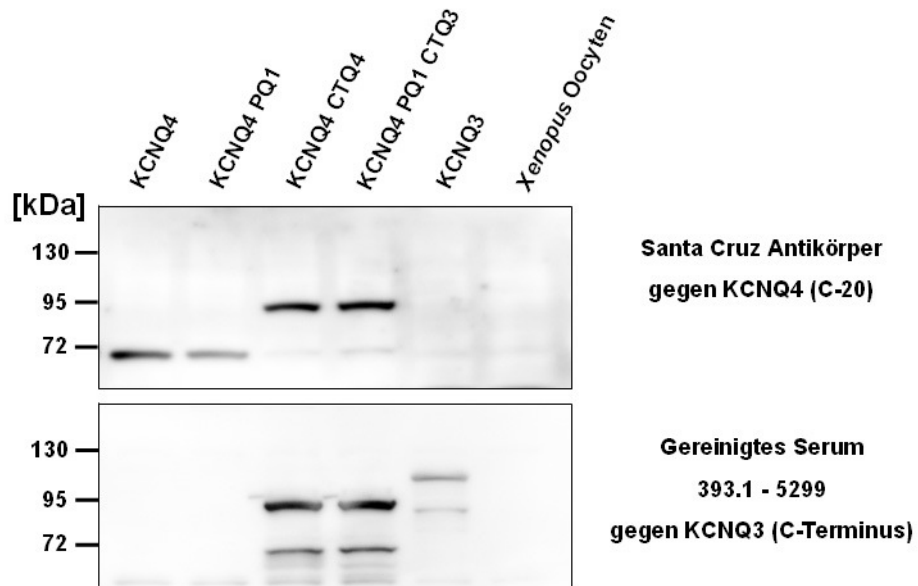


**Abbildung 3.35: Zusammenfassende Ergebnisse für die elektrophysiologisch untersuchten Chimären Q4PQ1, Q4CTQ3 und Q4PQ1CTQ3.** (A) Strom-/Spannungskurven für die bei 40mV anhand von KCNQ4 (Q4) normierten Ströme von Q4PQ1, Q4CTQ3 und Q4PQ1CTQ3. (B) Vergleich der anhand von KCNQ4 normierten maximalen Ströme bei 40mV Spannung. Die Ströme von Q4PQ1 sind etwa doppelt, die von Q4CTQ3 etwa fünf- bis sechsmal, die von Q4PQ1CTQ3 etwa neunmal so groß wie der Strom für KCNQ4 bei 40mV.

falls erhöhten Strömen führt. Möglicherweise besitzt die Porenregion von KCNQ1 insgesamt einen Strom verstärkenden Effekt. Beispielsweise durch spezielle Modifikationen im Bereich der Porenregion von KCNQ1, die einen verstärkenden Effekt auf die in *Xenopus* Oozyten gemessenen Ströme ausüben.

Die größten Ströme konnten für die weitere KCNQ4 Chimäre -KCNQ4(PQ1)CTQ3- mit der Porenregion von KCNQ1 und dem C-Terminus von KCNQ3 beobachtet werden. Die Abbildung 3.34 gibt einen Überblick über die Größe der Amplitude der für einen Zeitraum von zweieinhalb Sekunden gemessenen Ströme von KCNQ4, KCNQ4(PQ1), KCNQ4CTQ3 und KCNQ4(PQ1)CTQ3. Die beiden Chimären KCNQ4(PQ1)CTQ3 und KCNQ4CTQ3 mit dem C-Terminus von KCNQ3 zeigen deutlich veränderte Eigenschaften für die mit Hilfe der Zwei-Elektrodenklemmen-Methode gemessenen Ströme im Vergleich zu den gemessenen Strömen von KCNQ4 und KCNQ4(PQ1). Die beiden Kanäle KCNQ4(PQ1)CTQ3 und KCNQ4CTQ3 öffnen deutlich schneller, im Vergleich zu den beiden nur langsam öffnenden Kanälen KCNQ4 und KCNQ4(PQ1).

Es konnte daher analog zu den Ergebnissen von Maljevic et al., 2003 gezeigt werden, dass der Austausch des C-Terminus von KCNQ4 gegen den carboxyterminalen Bereich von KCNQ3 ebenfalls zu einer Steigerung der für die Chimäre KCNQ4CTQ3 in *Xenopus* Oozyten gemessenen Ströme führt. Da KCNQ3 jedoch nur Ströme mit einer geringen Amplitude zeigt, sind eventuell Bereiche vor dem C-Terminus von KCNQ3 für diesen Strom erniedrigenden Effekt verantwortlich. Möglicherweise wird die Höhe der Ströme von KCNQ3 durch ein Zusammenwirken des C-Terminus von KCNQ3 mit der Porenregion von KCNQ3 gesteuert.



**Abbildung 3.36: Western Blot Analyse der in *Xenopus* Oozyten injizierten cRNAs der Chimären von KCNQ4 Q4PQ1, Q4CTQ3, Q4PQ1CTQ3.** Die Charakterisierung der in den *Xenopus* Oozyten exprimierten Chimäre erfolgte anhand des (C-20) Antikörpers gegen KCNQ4 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA). Anschließend wurde die Membran für eine Wiederverwendung aufbereitet und erneut mit dem gereinigten polyklonalen Antikörper 393.1-5299 detektiert. Als Kontrolle dienten ausschließlich mit KCNQ3 injizierte Oozyten, sowie nicht injizierte Oozyten.

Durch den gleichzeitigen Austausch der Porenregion von KCNQ4 gegen die Porenregion von KCNQ1, sowie des C-Terminus von KCNQ4 gegen den C-Terminus von KCNQ3 konnten die gemessenen Ströme für die weitere Chimäre -Q4PQ1CTQ1- in ihrem Wert sogar noch gesteigert werden.

Die Abbildung 3.35 (A) gibt einen Überblick über die Strom-/Spannungskurven für die vier untersuchten und für die bei einer Spannung von 40mV für KCNQ4 normierten Ströme von KCNQ4, KCNQ4(PQ1), KCNQ4CTQ3 und KCNQ4(PQ1)CTQ3. Demnach scheinen die vier untersuchten Kanäle von KCNQ4 unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften zu besitzen. KCNQ4, KCNQ4(PQ1) und KCNQ4CTQ3 öffnen bei einer Spannung von ungefähr -60mV. KCNQ4(PQ1)CTQ3 hingegen scheint sogar schon bei einer Spannung von -80mV zu öffnen.

Der gleichzeitige Austausch der Porenregion von KCNQ4 gegen die Porenregion von KCNQ1, sowie des C-Terminus von KCNQ4 gegen den C-Terminus von KCNQ3 führt zu einer erkennbaren Veränderung der Öffnungseigenschaften der Chimären Kanäle von KCNQ4, da der Chimäre Kanal Q4PQ1CTQ3 bereits bei einer Spannung von -80mV geöffnet zu sein scheint (Abbildung 3.35A).

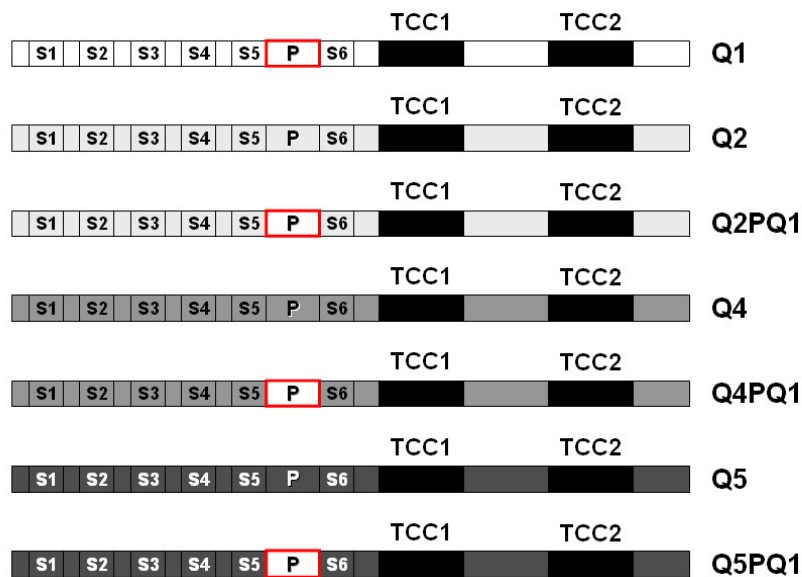
Die Abbildung 3.35 (B) zeigt zusammenfassend zur besseren Verdeutlichung die jeweils bei einer Spannung von 40mV und für KCNQ4 normierten Stromkurven von KCNQ4,

KCNQ4(PQ1), KCNQ4CTQ3 und KCNQ4(PQ1)CTQ3 im Vergleich übereinander gelegt. Der gemessene Strom von KCNQ4(PQ1) ist demnach doppelt, der gemessene Strom von KCNQ4CTQ3 ungefähr fünfmal und der Strom von KCNQ4(PQ1)CTQ3 ist ungefähr neunmal so groß wie der für KCNQ4 in *Xenopus* Oozyten gemessene Strom.

Nach der erfolgten elektrophysiologischen Messung wurden die mit cRNA von KCNQ4, KCNQ4(PQ1), KCNQ4CTQ3 und KCNQ4(PQ1)CTQ3 injizierten *Xenopus* Oozyten präpariert und durch eine Western Blot Analyse mit dem (C-20) KCNQ4 Antikörper und anschließend mit dem gereinigten Serum 393.1 gegen KCNQ3 charakterisiert. Es sollte mit Hilfe der Western Blot Analyse überprüft werden, ob die in *Xenopus* Oozyten gemessenen Ströme für die Chimären KCNQ4(PQ1), KCNQ4CTQ3 und KCNQ4(PQ1)CTQ3 ebenfalls mit einer gesteigerten Proteinexpression in Zusammenhang stehen. Die Abbildung 3.36 zeigt das Ergebnis für die Western Blot Analyse. Als Kontrolle dienten nur mit KCNQ3 oder nicht injizierte Membranpräparate von *Xenopus* Oozyten. Der (C-20) KCNQ4 Antikörper zeigte für KCNQ4 und KCNQ4(PQ1) ein Signal bei ungefähr 72kDa. Die beiden weiteren Chimären KCNQ4CTQ3 und KCNQ4(PQ1)CTQ3 mit dem gegen den C-Terminus von KCNQ4 ausgetauschten, längeren carboxyterminalen Bereich von KCNQ3 zeigten im Western Blot Signale bei ungefähr 90kDa bis 95kDa. Als Beweis, dass die beiden Chimären von KCNQ4 - KCNQ4CTQ3 und KCNQ4(PQ1)CTQ3- das carboxyterminale Ende von KCNQ3 besaßen, wurde der Western Blot anschließend erneut, diesmal mit dem gereinigten polyklonalen Serum 393.1 gegen KCNQ3 detektiert. Auch der gereinigte polyklonale Antikörper 393.1 gegen KCNQ3 zeigte für die beiden Chimären KCNQ4CTQ3 und KCNQ4(PQ1)CTQ3 ein Signal bei ungefähr 90kDa bis 95kDa und für KCNQ3 ein Signal bei ungefähr 100kDa. Jedoch konnte keine gesteigerte Proteinexpression für die untersuchten Chimäre KCNQ4(PQ1), KCNQ4CTQ3 und KCNQ4(PQ1)CTQ3 entdeckt werden, so dass die beobachteten erhöhten Ströme möglicherweise allein aufgrund einer veränderten Offenwahrscheinlichkeit der chimären Kanäle beruhen.

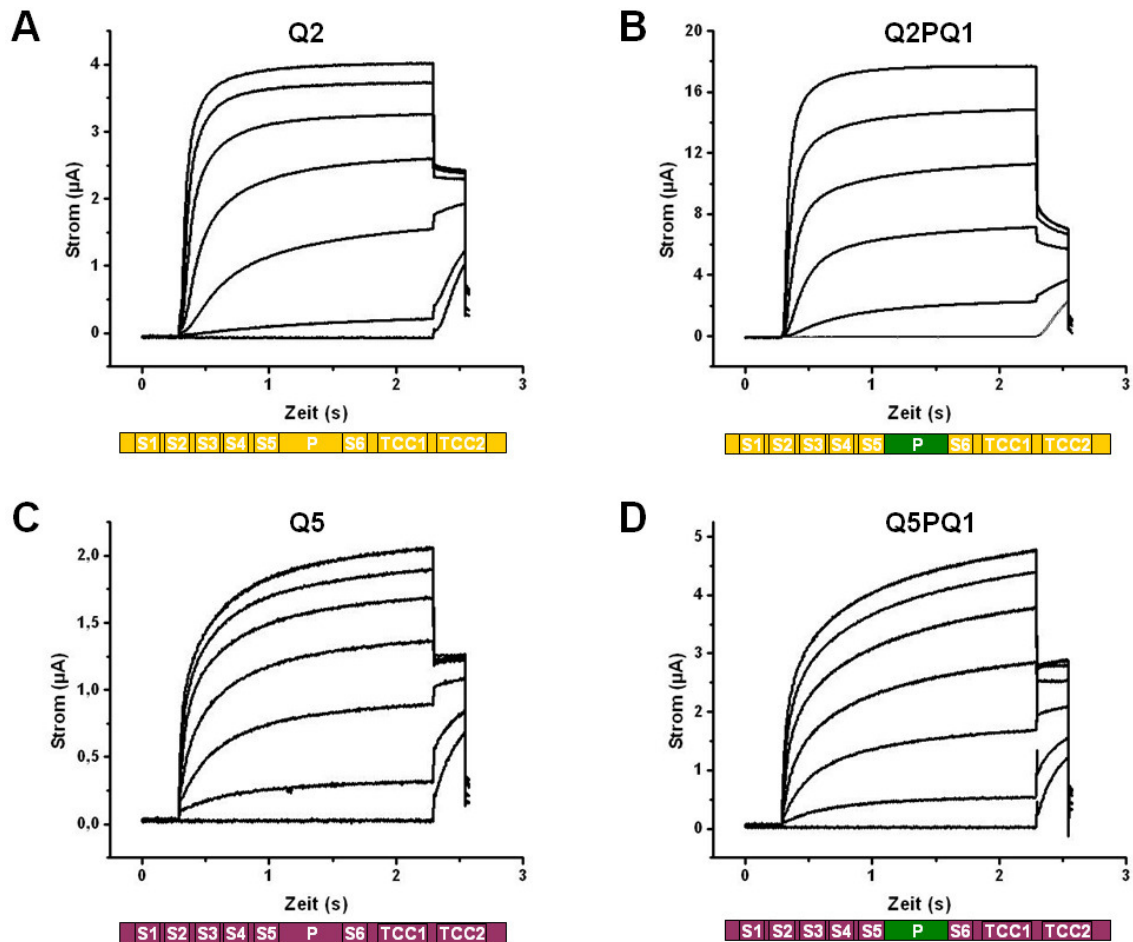
### **3.3.2 Untersuchungen zur Strom verstärkenden Wirkung der Porenregion von KCNQ1 (PQ1) anhand von KCNQ2 und KCNQ5 Chimären**

Die Abbildung 3.37 gibt einen Überblick über die Chimären KCNQ2(PQ1), KCNQ4(PQ1) und KCNQ5(PQ1) mit der Porenregion von KCNQ1 im Vergleich zu den unveränderten Kanälen KCNQ1, KCNQ2, KCNQ4 und KCNQ5.



**Abbildung 3.37: Schematische Übersicht über die Chimären bestehend aus dem Rückgrat von KCNQ2 (Q2), KCNQ4 (Q4) und KCNQ5 (Q5) mit der Porenregion von KCNQ1 (PQ1).** Daneben sind jeweils die schematischen Übersichtsgraphiken für die unveränderten  $\alpha$ -Untereinheiten KCNQ2, KCNQ4 und KCNQ5 abgebildet. Der Austausch der Porenregion von KCNQ2 gegen die Porenregion von KCNQ1 (PQ1), die hier zur besseren Verdeutlichung rot umrandet wurde, erfolgte von Position KCNQ2-G256 bis einschließlich KCNQ2-Q286. Der Austausch der Porenregion von KCNQ5 gegen die Porenregion von KCNQ1 (PQ1) hingegen geschah von Position KCNQ5-D255 bis einschließlich KCNQ5-L285.

Die Ströme für die untersuchten Chimären von KCNQ2 und KCNQ5 mit der Porenregion von KCNQ1 -KCNQ2(PQ1) und KCNQ5(PQ1)- unterschieden sich deutlich in der Größe der gemessenen Amplituden. Mit cRNA von KCNQ5(PQ1) injizierte *Xenopus* Oozyten zeigen etwa einen doppelt so großen Strom im Vergleich zu allein mit cRNA von KCNQ5 injizierten *Xenopus* Oozyten, für KCNQ2(PQ1) liegt die beobachtete Verstärkung des resultierenden Stroms für mit cRNA injizierte *Xenopus* Oozyten sogar bei einem Faktor von sechs im Vergleich zu den nur mit KCNQ2 cRNA injizierten *Xenopus* Oozyten. Die Abbildung 3.38 zeigt die Stromkurven für KCNQ2, KCNQ2(PQ1), KCNQ5 und KCNQ5(PQ1). Für KCNQ5 und KCNQ5(PQ1) scheinen die Stromkurven nahezu gleich, mit Ausnahme der Höhe des gemessenen Stroms von KCNQ5(PQ1), der in seinem Wert doppelt so groß ist wie der gemessene Strom für KCNQ5 allein. KCNQ Kanäle bestehend aus KCNQ2 und KCNQ2-(PQ1), sowie KCNQ4 und KCNQ4(PQ1) öffnen bei einer Spannung von  $-60\text{mV}$ , wie die Abbildung 3.39 verdeutlicht. Die Strom-/Spannungskurven für KCNQ5 und KCNQ5(PQ1) hingegen beweisen, dass diese beiden Kanäle schon bei einer Spannung unter  $-60\text{mV}$  öffnen. Für die drei Chimären KCNQ2(PQ1), KCNQ4(PQ1) und KCNQ5(PQ1) steigt die Strom-/Spannungskurve im Vergleich zu KCNQ2, KCNQ4 oder KCNQ5 deutlich steiler an. Die

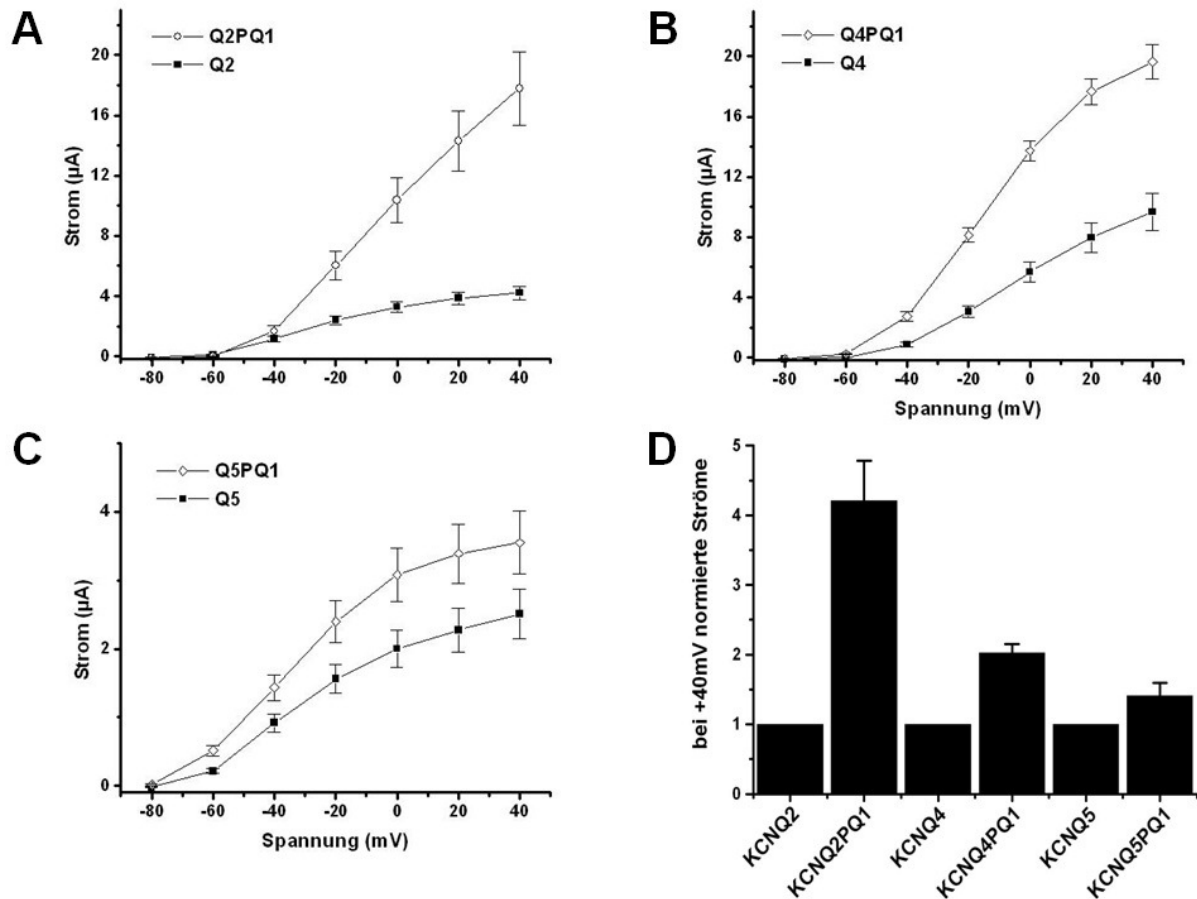


**Abbildung 3.38: Übersicht über die für KCNQ2 (Q2), Q2PQ1, KCNQ5 (Q5) und Q5PQ1 gemessenen Ströme.** *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit cRNA von Q2, Q2PQ1, Q5 und Q5PQ1 injiziert. Die elektrophysiologische Auswertung erfolgte zwei bis fünf Tage nach der cRNA Injektion. Eine Übersicht über die untersuchten Kanäle bieten zusätzlich die unterhalb der Stromkurven abgebildeten schematischen Abbildungen. Die Proteinrückgräter von KCNQ2 und KCNQ5 wurden gelb bzw. violett dargestellt Die Porenregion von KCNQ1 wurde in grün hervorgehoben.

Abbildung 3.39 (D) zeigt zusammenfassend die für den jeweils dazugehörigen Wildtyp, KCNQ2, KCNQ4 oder KCNQ5 bei einer Spannung von 40mV normierten Ströme für KCNQ2(PQ1), KCNQ4(PQ1) und KCNQ5(PQ1).

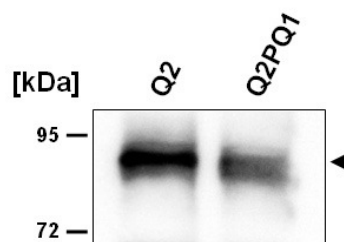
Im Anschluss zu den elektrophysiologischen Untersuchungen wurden die mit cRNA für KCNQ2 und KCNQ2(PQ1) untersuchten *Xenopus* Oozyten homogenisiert und die Membranproteine der untersuchten Oozyten präpariert. Die Abbildung 3.40 zeigt die Western Blot Analyse für die mit cRNA von KCNQ2 und KCNQ2(PQ1) injizierten *Xenopus* Oozyten. Die Charakterisierung erfolgte unter Verwendung des polyklonalen Antikörpers 392.1 gegen KCNQ2. KCNQ2 und KCNQ2(PQ1) zeigten ein Signal bei ungefähr 90kDa. Genau wie für die untersuchte Chimäre KCNQ4(PQ1) konnte im Western Blot keine Zunahme des Signals von KCNQ2(PQ1) im Vergleich zu dem Signal von KCNQ2 beobachtet werden. Auch hier scheint durch den Austausch der Porenregion von KCNQ2 gegen die Porenregion von



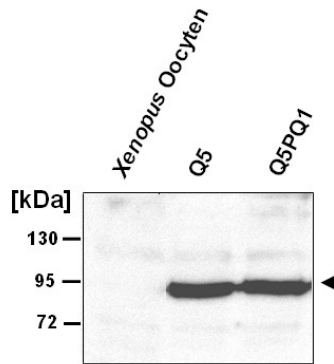


**Abbildung 3.39: Einfluss der Porenregion von KCNQ1 (PQ1) auf die spannungsabhängigen KCNQ Kanäle KCNQ2, KCNQ4 und KCNQ5.** Strom-/Spannungsdiagramme für KCNQ2 (Q2) und KCNQ2PQ1 (A), KCNQ4 (Q4) und KCNQ4PQ1 (B), KCNQ5 (Q5) und KCNQ5PQ1. (D) Balkendiagramm mit dem bei 40mV auf die Werte der Wildtypkanäle KCNQ2, KCNQ4 und KCNQ5 normierten Ströme von KCNQ2PQ1, KCNQ4PQ1 und KCNQ5PQ1. Den größten Effekt erzielte der Austausch der Porenregion von KCNQ2 mit der Porenregion von KCNQ1.

KCNQ1 keine erhöhte Expression der Kanalproteine stattzufinden. Die Abbildung 3.41 zeigt die Western Blot Analyse für die mit cRNA von KCNQ5 oder KCNQ(PQ1) injizierten *Xenopus* Oozyten unter Verwendung des KCNQ5 Antikörpers (C-17) von Santa Cruz Biotechnology Inc.. Als Kontrolle dienten nicht mit cRNA injizierte *Xenopus* Oozyten.



**Abbildung 3.40: Western Blot Analyse der mit cRNA von KCNQ2PQ1 injizierten *Xenopus* Oozyten.** Die Charakterisierung der mit KCNQ2PQ1 cRNA injizierten und präparierten Membranen erfolgte unter Verwendung des polyklonalen 392.1-5998 Antikörpers. Der Pfeil markiert das für KCNQ2PQ1 erhaltene Signal. Als Kontrolle dienten ausschließlich mit KCNQ2 cRNA injizierte Oozyten.

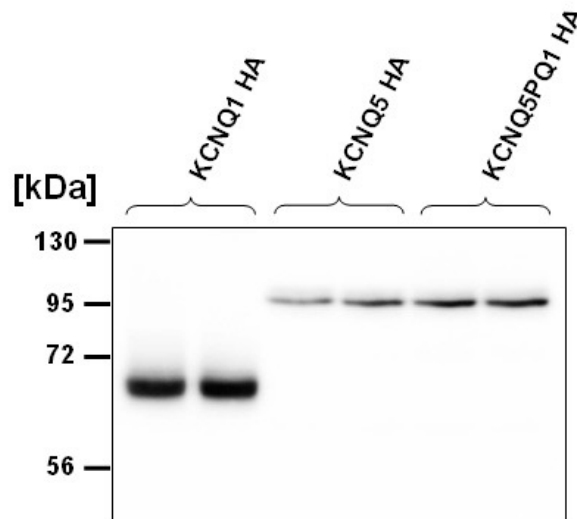


**Abbildung 3.41: Western Blot Analyse der mit cRNA von KCNQ5PQ1 und KCNQ5 injizierten *Xenopus* Oozyten.** Die Charakterisierung erfolgte anhand des Anti KCNQ5 Antikörpers (C-17) von Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, USA). Als Kontrolle dienten ausschließlich mit KCNQ5 injizierte und nicht injizierte *Xenopus laevis* Oozyten. Der Pfeil zeigt auf die detektierten Signale für KCNQ5 und die Chimären KCNQ5PQ1 und KCNQ5(S5S6Q4).

Die für KCNQ5 und KCNQ5(PQ1) detektierten Signale lagen bei ungefähr 95kDa. Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch der Porenregion von KCNQ2, KCNQ4 und KCNQ5 gegen die Porenregion von KCNQ1 insgesamt einen stimulierenden Effekt auf die Höhe der gemessenen Ströme für die Chimären KCNQ2(PQ1), KCNQ4(PQ1) und KCNQ5(PQ1) im Vergleich zu den unveränderten Kanälen von KCNQ2, KCNQ4 und KCNQ5 hat. Diese Beobachtung könnte möglicherweise mit der für die Porenregion von KCNQ1 beschriebenen N-Glykosylierungsstelle in Zusammenhang stehen. Beispielsweise könnte eine N-Glykosylierung einen verstärkten Transport an die Zelloberfläche begünstigen, so dass eventuell eine größere Anzahl von Kanälen gleichsam zu einer Erhöhung der gemessenen Ströme geführt hat.

### 3.3.3 Vergleichende Untersuchungen zur Expression von KCNQ1 und KCNQ5 in COS-7 Zellen

Die für KCNQ3(PQ;1) von Schenzer et al., 2005 beobachteten größeren Ströme, im Vergleich zu KCNQ3, sollten in Zusammenhang mit einer erhöhten Oberflächenexpression von KCNQ3(PQ;1) im Vergleich zu KCNQ3 stehen. Hierfür wurden wiederholt um den Faktor 10 verstärkte Signale für Western Blot Analysen des carboxyterminal HA markierten Kanals KCNQ1 im Vergleich zu den Signalen des ebenfalls carboxyterminal HA markierten Kanals von KCNQ5 beobachtet. Da KCNQ1 als einziger *KCNQ* Kanal eine N-Glykosylierungsstelle besitzt, wurde vermutet, dass der Austausch der Porenregion von KCNQ5 gegen die Poren-



**Abbildung 3.42:** Western Blot Analyse der transient in COS-7 transfizierten und HA markierten KCNQ Kanäle KCNQ1HA, KCNQ5HA und KCNQ5PQ1HA. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Anti HA Antikörpers 3F10 (Roche, Mannheim, Deutschland). Die Expression von KCNQ1 ist deutlich verstärkt im Vergleich zur nahezu gleich starken Expression von KCNQ5 und KCNQ5PQ1.

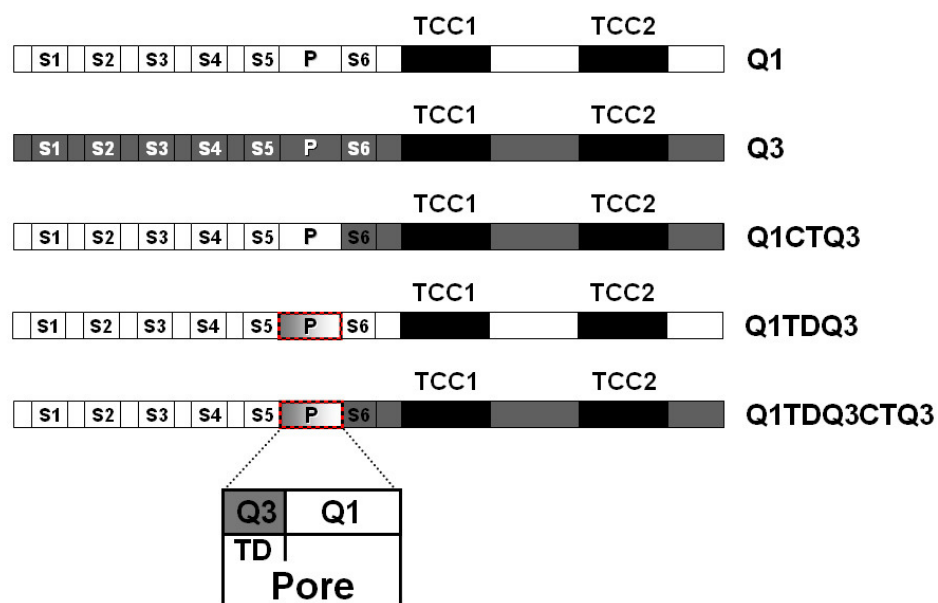
region von KCNQ1 ebenfalls zu stärkeren Signalen in Western Blot führt. Möglicherweise ist dies auch der Grund, warum KCNQ1 jeweils stärkere Signale im Western Blot ergibt als die anderen KCNQ Kanäle KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 und KCNQ5.

Zur Untersuchung der Annahme, dass die N-Glykosylierung von KCNQ1 für die erhöhte Proteinexpression verantwortlich ist, wurde die Chimäre KCNQ5(PQ1) mit der Porenregion von KCNQ1 in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert und ebenfalls carboxy-terminal HA markiert. Anschließend wurden COS-7 Zellen transient mit KCNQ1HA, KCNQ5HA und KCNQ5(PQ1)HA transfiziert. Die Abbildung 3.42 zeigt das Ergebnis für die Western Blot Analyse der mit KCNQ1HA, KCNQ5HA und KCNQ5(PQ1)HA transfizierten COS-7 Zellen. Die Charakterisierung des Western Blots erfolgte unter Verwendung des 3F10 Antikörpers. KCNQ1HA zeigte im Western Blot ein Signal bei ungefähr 65kDa, KCNQ5HA und KCNQ5(PQ1)HA hingegen bei ungefähr 95kDa. Wie des öfteren beobachtet, war das Signal im Western Blot für KCNQ1HA deutlich stärker im Vergleich zu KCNQ5HA und KCNQ5(PQ1)HA. Für KCNQ5HA und KCNQ5(PQ1)HA konnte kein Unterschied in Bezug auf die im Western Blot beobachteten Signale wahrgenommen werden.

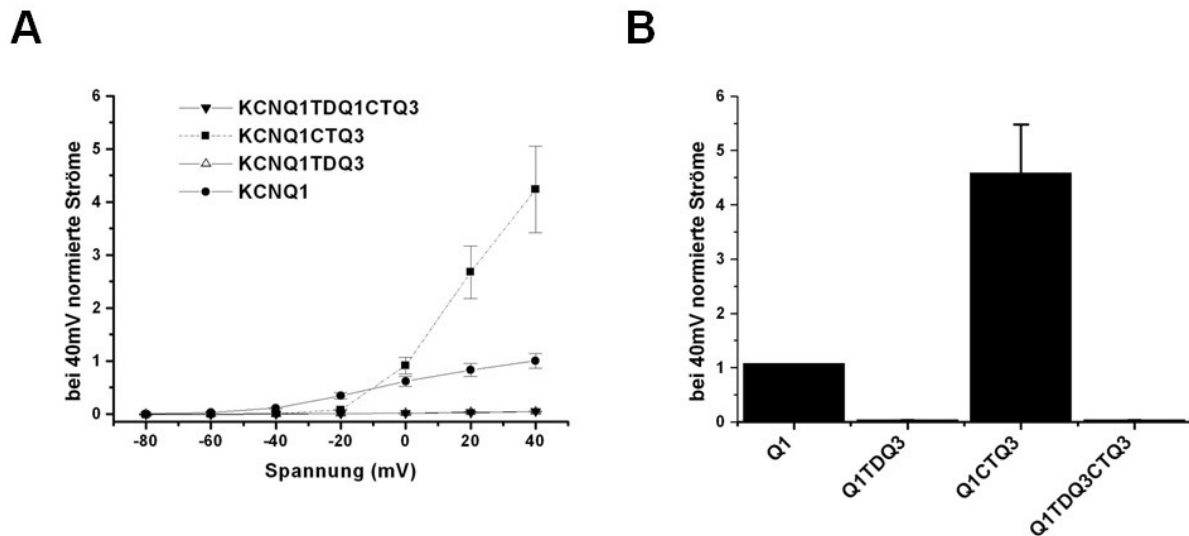
Insgesamt konnte durch den Austausch der Porenregion von KCNQ5 gegen die Porenregion von KCNQ1 keine Verstärkung in Bezug auf die Proteinexpression in COS-7 Zellen beobachtet werden.

### 3.3.4 Untersuchungen zur Strom erniedrigenden Wirkung der Turret Domäne und des C-Terminus von KCNQ3 (TDQ3) anhand von Chimären mit KCNQ1

Da die Porenregion von KCNQ1 einen stimulierenden Effekt auf die Größe der gemessenen Ströme für die Chimären KCNQ2(PQ1), KCNQ4(PQ1) und KCNQ5(PQ1) ausübte, wurde im Folgenden untersucht, inwieweit sich der Austausch der Turret Domäne von KCNQ3 ohne die für die Porenregion von KCNQ1 beschriebene N-Glykosylierungsstelle auf die resultierenden Ströme von KCNQ1 auswirkt. Die Chimäre von KCNQ1, bei der die Turret Domäne von KCNQ1 gegen die Turret Domäne von KCNQ3 ausgetauscht wurde, hieß KCNQ1TDQ3. Zusätzlich wurde eine weitere Chimäre kloniert, bei der ebenfalls die Turret Domäne von KCNQ1 gegen die Turret Domäne von KCNQ3 ausgetauscht wurde und die auf der von

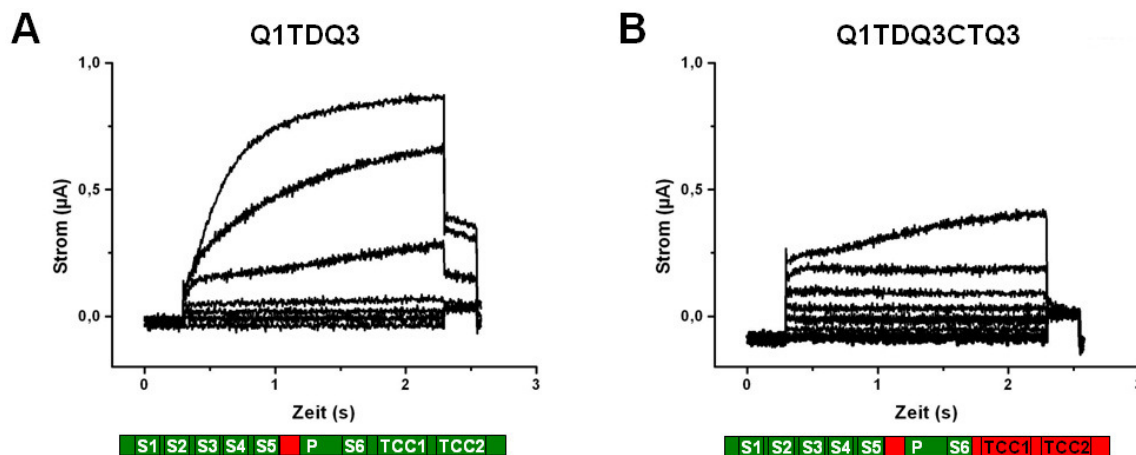


**Abbildung 3.43:** Schematische Übersicht über verschiedene Chimären von KCNQ1 (Q1) mit der Turret Domäne von KCNQ3 (TDQ3) oder dem carboxyterminalen Bereich von KCNQ3 (CTQ3). Der Bereich der „turret domain“ macht nur einen Teil der gesamten, zwischen den Transmembranregionen S5 und S6 befindlichen Porenregion aus. KCNQ3 besitzt keine N-Glykosylierungsstelle im Bereich der Turret Domäne von Position KCNQ3-V286 bis KCNQ3-T302. Der Austausch der Turret Domäne von KCNQ1 gegen die Turret Domäne von KCNQ3 erfolgte von Position KCNQ1-A287 bis KCNQ1-S298. Die Chimäre KCNQ1CTQ3 wurde 2003 von Snezana Maljevic kloniert. Der C-Terminus von KCNQ3 beginnt direkt hinter der sechsten Transmembrandomäne von KCNQ3 und enthält die si-Domäne von KCNQ3 mit den beiden hochgradig helikal spiralisierten TCC-Domänen TCC1 und TCC2. Die Chimäre KCNQ1TDQ3CTQ3 enthält sowohl die Turret Domäne von KCNQ3, als auch den carboxyterminale Bereich von KCNQ3 mit den Proteinrückgrat von KCNQ1.

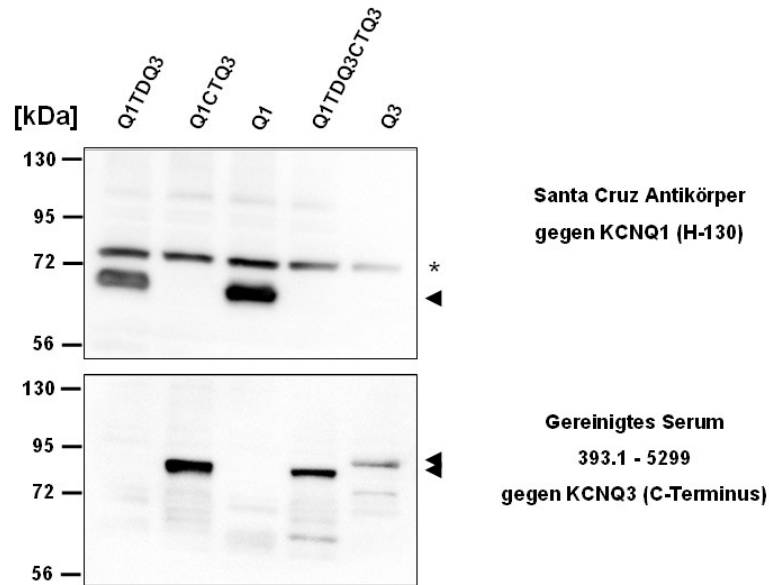


**Abbildung 3.44: Auswertung der elektrophysiologischen Untersuchungen für die mit cRNA von KCNQ1 (Q1), KCNQ1TDQ3, KCNQ1CTQ3 und KCNQ1TDQ3CTQ3 injizierten *Xenopus* Oozyten.** (A) Strom-/Spannungskurven für die untersuchten Chimären von KCNQ1, KCNQ1TDQ3, KCNQ1CTQ3 und KCNQ1TDQ3CTQ3. Die gemessenen Ströme für KCNQ1TDQ3 und KCNQ1TDQ3CTQ3 sind unter  $0,5\mu\text{A}$ . (B) Vergleich der bei 40mV mit Q1 normierten Ströme von KCNQ1TDQ3, KCNQ1CTQ3 und KCNQ1TDQ3CTQ3 in Form eines Balkendiagramms.

Maljevic et al., 2003 konstruierten Chimäre KCNQ1CTQ3 basierte. Die Abbildung 3.43 gibt einen Überblick über die synthetisierten Chimären KCNQ1TDQ3 und KCNQ1TDQ3CTQ3, sowie über die von Maljevic et al., 2003 konstruierte Chimäre KCNQ1CTQ3. Für mit cRNA von KCNQ1CTQ3 injizierte *Xenopus* Oozyten konnte, im Gegensatz zu den von Maljevic et al., 2003 beschriebenen Ergebnissen, ein nur fünffach verstärkter Strom im Vergleich zu nur mit KCNQ1 cRNA injizierten *Xenopus* Oozyten beobachtet werden (Abbildung 3.44).



**Abbildung 3.45: Übersicht über die für KCNQ1TDQ3 (A) und KCNQ1TDQ3CTQ3 (B) in *Xenopus laevis* Oozyten gemessenen Ströme.** KCNQ1TDQ3 zeigt Ströme, die in ihrer Form denen von KCNQ1 entsprechen. Für KCNQ1TDQ3CTQ3 konnten nur schwache Signale gemessen werden, die in ihrer Amplitude und Form stark von denen der übrigen KCNQ Kanäle abweichen und eher unspezifisch erscheinen. Unterhalb der Stromkurven befinden sich schematische Übersichtsbilder zu den untersuchten Kanälen. In grün wurde das Proteingrückgrat von KCNQ1 hervorgehoben. Von KCNQ3 stammende Proteinsequenzen wurden hingegen in rot dargestellt.



**Abbildung 3.46: Expression von KCNQ1 (Q1), KCNQ1CTQ3, KCNQ1TDQ3 und KCNQ1TDQ3CTQ3 nach cRNA Injektion in *Xenopus* Oozyten.** Der Santa Cruz Antikörper (H130) erkennt nur das carboxyterminale Ende von KCNQ1, beispielsweise für KCNQ1 (Q1) und KCNQ1TDQ3. \*Außerdem erkennt der (H-130) Antikörper von Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, USA) ein weiteres unspezifisches Signal bei ungefähr 80kDa. Die weiteren chimären Proteine KCNQ1CTQ3 und KCNQ1TDQ3CTQ3 werden von dem polyklonalen Antikörper 393.1 erkannt. Als Kontrolle dienten ausschließlich mit KCNQ3 (Q3) cRNA injizierte *Xenopus* Oozyten. Die Pfeile markieren die detektierten Signale für KCNQ1, KCNQ1TDQ3, KCNQ1CTQ3, KCNQ1TDQ3CTQ3 und KCNQ3.

Für die konstruierte Chimäre von KCNQ1 und KCNQ3 -KCNQ1TDQ3- konnte für mit cRNA von KCNQ1TDQ3 injizierte *Xenopus* Oozyten nur ein sehr schwacher Strom beobachtet werden. Für mit cRNA von KCNQ1TDQ3CTQ3 injizierte *Xenopus* Oozyten wurden nur schwache Signale und keine richtigen Ströme wahrgenommen, so dass es sich bei KCNQ1TDQ3CTQ3 wahrscheinlich um keinen funktionstüchtigen Kaliumkanal handelt, wie die Abbildung 3.45 verdeutlicht. Dennoch zeigte die Western Blot Analyse für die vier zuvor elektrophysiologisch untersuchten KCNQ Kanäle KCNQ1, KCNQ1TDQ3, KCNQ1CTQ3 und KCNQ1TDQ3CTQ3 positive Signale (Abbildung 3.46). Die Detektion der beiden unmarkierten KCNQ Kanäle KCNQ1 und KCNQ1TDQ3 aus *Xenopus* Oozyten mit dem KCNQ1 Antikörper führte zu positiven Signalen bei ungefähr 65kDa bis 70kDa. Die beiden Kanäle KCNQ1CTQ3 und KCNQ1TDQ3CTQ3 wurden aufgrund des ausgetauschten C-Terminus nicht von dem Santa Cruz Antikörper gegen KCNQ1 erkannt. Die Detektion der beiden weiteren KCNQ Kanäle KCNQ1CTQ3 und KCNQ1TDQ3CTQ3 erfolgte unter Verwendung des gereinigten polyklonalen Serums 393.1 gegen KCNQ3. Die Größe der beobachteten Signale für die beiden durch Western Blot Analyse charakterisierten Chimären KCNQ1CTQ3 und KCNQ1TDQ3CTQ3 lag bei 95kDa. Als Kontrolle dienten nur mit cRNA

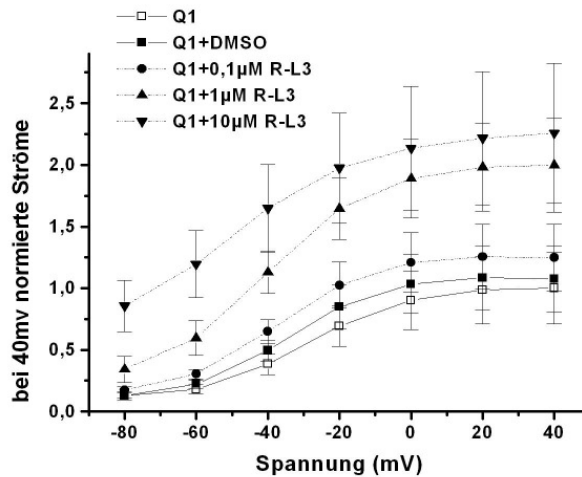
von KCNQ3 injizierte *Xenopus* Oozyten, die im Western Blot mit dem eingesetzten polyklonalen Antikörper 393.1 gegen KCNQ3 ein Signal bei 100kDa ergaben.

Ingesamt konnte gezeigt werden, dass der Austausch der Turret Domäne von KCNQ1 gegen die Turret Domäne von KCNQ3 zu einer Abnahme des gemessenen Stroms für die Chimäre Q1TDQ3 führt. In weiteren elektrophysiologischen Experimenten mit der Chimäre Q1TDQ3CTQ3 kam es trotz des Austausches des C-Terminus KCNQ1 gegen den C-Terminus von KCNQ3 nicht zu einer Steigerung der in *Xenopus* Oozyten gemessenen Ströme. Möglicherweise führt ein Zusammenwirken des C-Terminus mit der Turret Domäne von KCNQ3 daher zu einer Regulation der Öffnung von KCNQ3, wodurch die nur geringen Ströme für den homomeren Kanal von KCNQ3 im Vergleich zu den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Chimären mit dem C-Terminus von KCNQ3 zu erklären wären.

### **3.4 Pharmakologische Untersuchungen zur Wirkung von R-L3 auf die Familie der spannungsabhängigen KCNQ Kanäle**

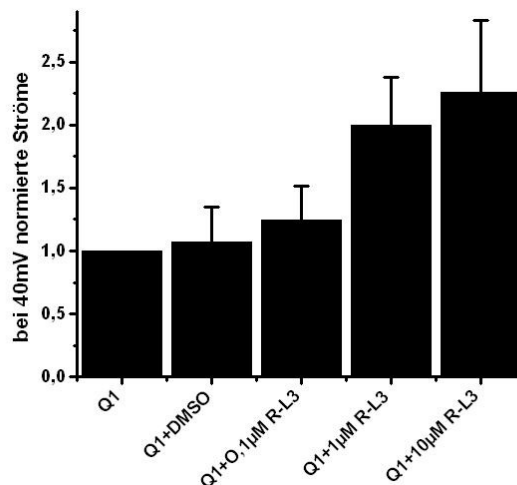
#### **3.4.1 Untersuchungen zur Interaktion von KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 und KCNQ5 mit dem Benzodiazepin R-L3**

Für die Familie der spannungsabhängigen KCNQ Kanäle sind eine Reihe von pharmakologischen Substanzen bekannt, die einen direkten Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Kaliumkanäle ausüben. Eine dieser Substanzen ist das zu den Benzodiazepin gehörige R-L3. Die Wirkung von R-L3 auf die erste *KCNQ*  $\alpha$ -Untereinheit wurde 1998 von Salata et al. beschrieben. Die beobachteten Effekte von R-L3 auf KCNQ1 sind vielfältig. R-L3 ist demnach die erste pharmakologische Substanz, die einen aktivierenden Einfluss auf den von KCNQ1 und KCNE1 verursachten  $I_{KS}$ -Strom des Herzens ausübt. Für nur mit KCNQ1 injizierte *Xenopus* Oozyten konnte sogar ein noch stärkerer Einfluss, als für mit KCNE und KCNQ1 koinjizierte *Xenopus* Oozyten beobachtet werden, da der mögliche Bereich der Interaktion von R-L3 auf den Bereich der fünften und sechsten Transmembrandomäne von KCNQ1 von Seeböhm et al., 2003 eingegrenzt wurde. Der Effekt von R-L3 auf die teilweise erst nach der Entdeckung von R-L3 weiteren beschriebenen *KCNQ*  $\alpha$ -Untereinheiten ist derzeit noch unbekannt. Aus diesem Grund wurden die weiteren *KCNQ*-Kanäle KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 und KCNQ5 unter Verwendung von R-L3 in mit cRNA injizierten *Xenopus* Oozyten untersucht. Die Abbildung 3.47 zeigt den Effekt von dem in



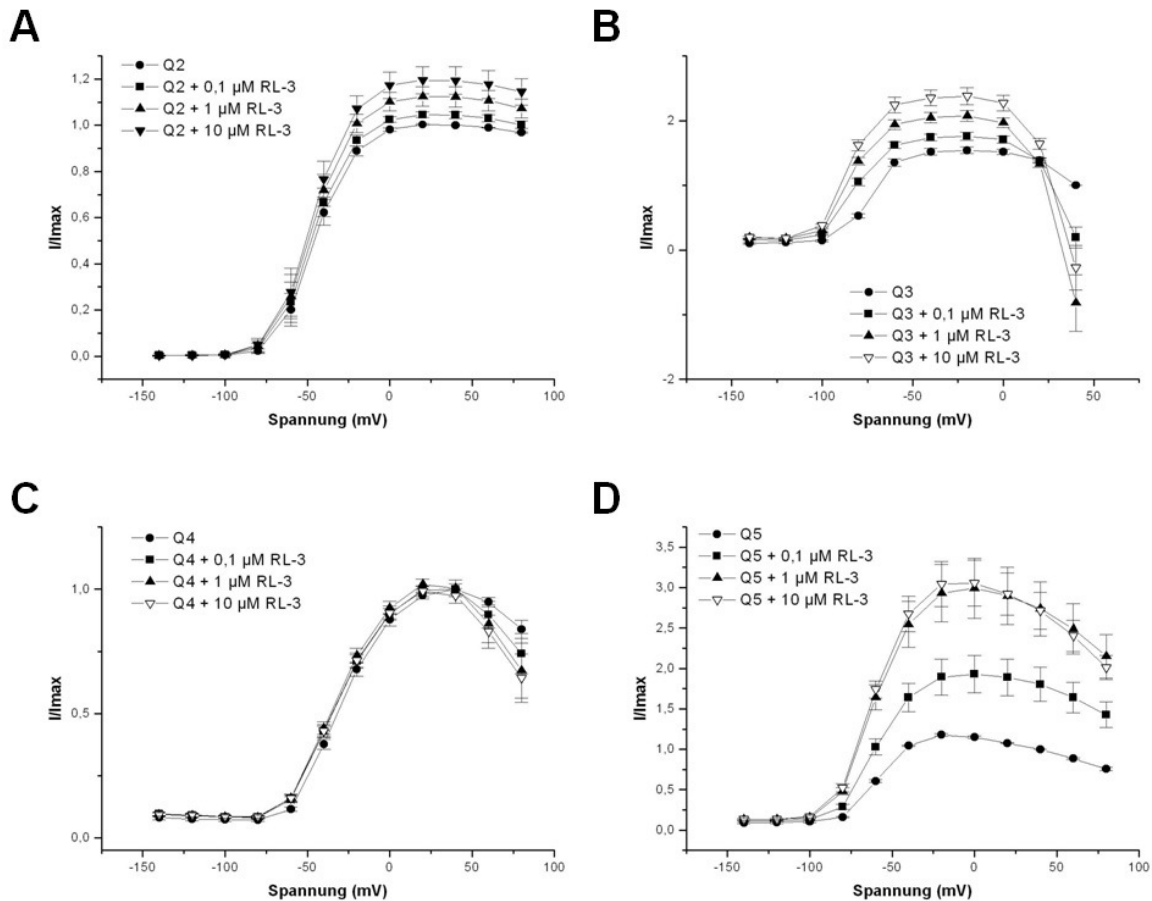
**Abbildung 3.47: Effekt von R-L3 auf mit cRNA von KCNQ1 injizierte *Xenopus* Oozyten.** Mit KCNQ1 cRNA injizierte *Xenopus* Oozyten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von 0,1µM, 1µM und 10µM an R-L3 behandelt. Die Normierung der Strom-/Spannungskurven erfolgte anhand der bei 40mV für den unbehandelten Kanal KCNQ1 gemessenen Ströme. Als zusätzliche Kontrolle erfolgte eine Messung mit dem R-L3 Lösungsmittel Dimethylsulfoxid, kurz DMSO, das ebenso wie das R-L3 1:1000 in ND-96 Puffer angesetzt wurde.

DMSO angesetzt und in ND96 Puffer gelösten R-L3 auf mit cRNA von KCNQ1 injizierte und elektrophysiologisch mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode untersuchte *Xenopus* Oozyten. Als Kontrolle für die verwendeten Lösungsmittel diente nur mit DMSO (1:1000) angereicherte ND96 Pufferlösung. Die gemessenen Ströme für die mit einer unterschiedlichen Konzentration an R-L3 behandelten und mit cRNA von KCNQ1 injizierten *Xenopus* Oozyten wurden auf die Werte für die nur mit ND96 Puffer gemessenen *Xenopus*



**Abbildung 3.48: Effekt von R-L3 auf die anhand des unbehandeltem Kanals von KCNQ1 bei 40mV normierten Ströme.** cRNA von KCNQ1 wurde in *Xenopus* Oozyten injiziert und nach drei Tagen unter Verwendung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode elektrophysiologisch untersucht. Die Messung der in dem Bad befindlichen und mit KCNQ1 injizierten Oozyte erfolgte zuerst unter Verwendung von ND96 Puffer. Anschließend wurde die normale ND96 Pufferlösung gegen einen DMSO [1:1000] enthaltenden ND96 Puffer ausgetauscht. Erst darauf erfolgte die Messung der mit KCNQ1 injizierten *Xenopus* Oozyten für die drei verschiedenen Konzentrationen von 0,1µM, 1µM und 10µM an dem Benzodiazepin R-L3.

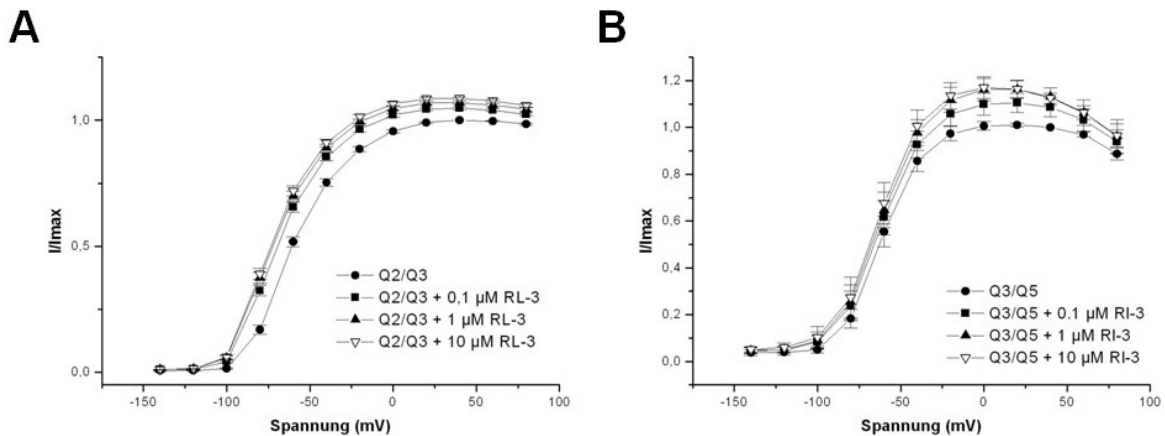




**Abbildung 3.49: Effekt von R-L3 auf die  $\alpha$ -Untereinheiten KCNQ2 (A), KCNQ3 (B), KCNQ4 (C) und KCNQ5 (D).** Gezeigt sind die Strom-/Spannungskurven für die Inaktivierungsströme der mit R-L3 untersuchten Kanäle KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 und KCNQ5. Die bei einer halbmaximalen Spannung von  $-30\text{mV}$  normierten Werte wurden mit Hilfe des Computerprogramms Microcal Origin 5.0 (Microcal Software Inc., USA) unter Verwendung der Boltzmann-Gleichung aneinander angeglichen. Den deutlichsten Effekt übt R-L3 auf mit cRNA von KCNQ5 injizierte *Xenopus laevis* Oozyten aus.

Oozyten mit KCNQ1 normiert. In ND96 verdünntes DMSO (1:1000) zeigt keinen signifikanten Effekt auf die für KCNQ1 in *Xenopus* Oozyten gemessenen Ströme. R-L3 jedoch hat bereits bei einer Konzentration von  $0,1\text{mM}$  einen aktivierenden Effekt auf die Strom-/Spannungskurve von KCNQ1. Eine Erhöhung der R-L3 Konzentration auf  $1\mu\text{M}$  führt zu einer weiteren Steigerung für die resultierende Strom-/Spannungskurve von KCNQ1. Bei einer eingesetzten Konzentration von  $10\mu\text{M}$  an R-L3 kommt es im Gegensatz zu beobachteten Ergebnissen von Salata et al., 1998, die bei einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  an R-L3 einen inhibierenden Effekt auf die Ströme von KCNQ1 feststellten, zu einer weiteren Steigerung der Werte für die resultierende Strom-/Spannungskurve von den mit cRNA von KCNQ1 injizierten *Xenopus* Oozyten.

Die Abbildung 3.48 dient zur zusätzlichen Veranschaulichung der mit cRNA von KCNQ1 injizierten und mit den Konzentrationen von  $0,1\mu\text{M}$ ,  $1\text{mM}$  und  $10\text{mM}$  behandelten *Xenopus* Oozyten. Die für DMSO und für die verwendeten Konzentrationen an R-L3 von  $0,1\mu\text{M}$ ,  $1\mu\text{M}$



**Abbildung 3.50: Effekt von R-L3 auf die heteromeren KCNQ Kanäle bestehend aus KCNQ2 und KCNQ3 (A), sowie KCNQ3 und KCNQ5 (B).** Gezeigt sind die mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung angeglichenen Strom-/Spannungskurven der bei der halbmaximalen Spannung von 30 mV normierten Ströme für die heteromeren KCNQ Kanäle KCNQ2/KCNQ3, sowie KCNQ3/KCNQ5. Die Messung der untersuchten heteromeren Kanäle erfolgte zuerst ohne das Benzodiazepin R-L3, anschließend wurde für die Messung 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M in ND96 Puffer gelöstes R-L3 verwendet.

und 10  $\mu$ M gemessenen Werte der mit cRNA von KCNQ1 injizierten *Xenopus* Oozyten wurden für den Wert des gemessenen Stroms bei einer Spannung von 40mV für die unbehandelten und mit cRNA von KCNQ1 injizierten *Xenopus* Oozyten normiert.

Für die Untersuchung mit R-L3 wurden *Xenopus* Oozyten mit cRNA von KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 oder KCNQ5 injiziert. Nach einer drei- bis fünftägigen Ruhephase erfolgte die Messung durch die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode. Die Abbildung 3.49 zeigt die gemessenen und unter Verwendung des Computerprogramms Microcal Origin 5.0 (Microcal Software Inc.,USA) ausgewerteten nicht stationären Ströme (*tail currents*) für KCNQ2 (A), KCNQ3 (B), KCNQ4 (C) und KCNQ5 (D). Für KCNQ2 und KCNQ3 führte die Behandlung mit den unterschiedlichen Konzentrationen von 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M an R-L3 zu nur leicht erhöhten Strömen, wie die Abbildungen 3.49 (A) und (B) zeigen. Für KCNQ4 konnte gar kein Effekt von R-L3 auf die resultierenden Ströme der mit cRNA von KCNQ4 injizierten *Xenopus* Oozyten beobachtet werden. Jedoch konnte für mit cRNA von KCNQ5 injizierte *Xenopus* Oozyten ein signifikanter Einfluss von R-L3 beobachtet werden, wie die Abbildung 3.49 (D) verdeutlicht. Die aufeinander folgende Behandlung von mit cRNA von KCNQ5 injizierten *Xenopus* Oozyten mit 0,1  $\mu$ M und 1  $\mu$ M R-L3 führte zu einer stufenweisen Erhöhung der gemessenen Ströme. Mit einer Konzentration von 10  $\mu$ M an R-L3 behandelte und mit cRNA von KCNQ5 injizierte *Xenopus* Oozyten erzielten Ströme, die denen der mit 1  $\mu$ M an R-L3 behandelten *Xenopus* Oozyten ähnelten und nicht noch stärker waren.

Für heteromere KCNQ Kanäle bestehend aus KCNQ5 und KCNQ3 konnte der zuvor für homomere Kanäle von KCNQ5 beobachtete signifikante Effekt von R-L3 auf die resultierenden Ströme nicht beobachtet werden. Die Abbildung 3.50 zeigt die gemessenen

Inaktivierungskurven für die heteromeren und mit R-L3 untersuchten Kanäle von KCNQ2 mit KCNQ3 (A) und KCNQ5 und KCNQ3 (B). Nach Zugabe von 0,1 $\mu$ M an R-L3 kommt es nur zu einem leichten Anstieg der gemessenen Ströme für die heteromeren Kanäle von KCNQ2 mit KCNQ3, sowie für KCNQ5 mit KCNQ3. Eine weitere Erhöhung der R-L3 Konzentration auf 1 $\mu$ M oder sogar 10 $\mu$ M hat keinen weiteren stimulierenden Effekt auf die in *Xenopus* Oozyten gemessenen Ströme der heteromeren KCNQ Kanäle von KCNQ2 mit KCNQ3, sowie für KCNQ5 mit KCNQ3. Homomere Kanäle von KCNQ5 scheinen neben KCNQ1 daher die einzigen beiden bekannten KCNQ Kanäle zu sein, die sensitiv auf die untersuchten Konzentrationen von 0,1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M und 10 $\mu$ M an R-L3 reagieren und von R-L3 aktiviert werden können.

## 4. Diskussion

### 4.1 Assemblierung von spannungsabhängigen KCNQ Kaliumkanälen

#### 4.1.1 Untersuchungen zur si-Domäne spannungsabhängiger KCNQ Kanäle

KCNQ Kanäle gehören zur Familie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle. Es handelt sich hierbei um eine Gruppe von Kaliumkanälen, die eine wichtige Funktion bei der Weiterleitung neuronaler Impulse übernehmen. Mutationen von KCNQ1, KCNQ2, KCNQ3 und KCNQ4 konnten schon früh mit einer Reihe von Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden, durch die unter anderem die Repolarisation von Nervenzellen des Herzen und des Gehirns, aber auch der Kaliumtransport aus den Haarzellen des Innenohrs beeinträchtigt wird. Mutationen von KCNQ5 hingegen führen zu keinem auffälligen Phänotyp.

KCNQ Kanäle zeichnen sich sowohl durch eine homo- als auch eine heteromere Assemblierung aus. Der zuerst beschriebene KCNQ Kanal KCNQ1 bildet dabei nur mit sich selbst homotetramere Kanäle (Jentsch et al., 2000). Darüber hinaus wurden aber auch Interaktionen von KCNQ1 mit den weiteren fünf bekannten  $\beta$ -Untereinheiten KCNE1 bis KCNE5 beschrieben (Heizmann et al., 2007).

Die weiteren KCNQ  $\alpha$ -Untereinheiten KCNQ2, KCNQ4 und KCNQ5 können mit KCNQ3 heterotetramere Kanäle bilden (Schwake et al., 2003), wobei mit KCNQ2 und KCNQ3 koinjizierte *Xenopus laevis* Oozyten einen um den Faktor hundert gesteigerten Strom im Vergleich zu den homomeren Kanälen von KCNQ3 zeigen (Schwake et al., 2000).

Eine Interaktion der jeweiligen Untereinheiten geschieht für eine Reihe von spannungsabhängigen Kaliumkanälen über eine aminoterminal gelegene Interaktionsdomäne, die sogenannte T1-Domäne (Li et al., 1992; Kreuzsch et al., 1998). Dabei handelt es sich um ein sogenanntes BTB/POZ Motiv, bestehend aus insgesamt drei  $\beta$ -Faltblättern und fünf  $\alpha$ -Helices. Diese T1-Domäne ist zum einen für die Assemblierung von spannungsabhängigen 6TM/1P Shaker-Kanälen verantwortlich, zum anderen bewirkt das Vorhandensein dieser T1-Domäne einen verstärkten Transport an die Zelloberfläche in Axonen. Eine Deletion dieser T1 Domäne führt zu einer dramatischen, aber nicht gänzlichen Abnahme der tetrameren *Shaker*-Kanäle (Minor et al., 2000).

Für die Familie der KCNQ Kanäle konnte keine solche T1-Domäne, weder amino- noch carboxyterminal, identifiziert werden. Im Gegensatz zu den meisten spannungsabhängigen Kaliumkanälen, besitzen KCNQ Kanäle jedoch einen ungefähr 100 Aminosäuren großen

carboxyterminal gelegenen Bereich, die sogenannte si-Domäne, die für die Assemblierung der  $\alpha$ -Untereinheiten notwendig zu sein scheint (Schwake et al., 2003).

Für die genauere Untersuchung der si-Domäne wurden daher im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe von Mutationen in den Bereich dieser Interaktionsdomäne für die zuerst von Schwake et al., 2003 beschriebene Chimäre Q1sidQ3 mit dem Proteinrückgrat von KCNQ1 und der gegen die si-Domäne von KCNQ1 ausgetauschten si-Domäne von KCNQ3 eingefügt, um durch eventuelle Veränderungen des gemessenen Stroms für den heteromeren KCNQ Kanal mit KCNQ2 Rückschlüsse über die für die Interaktion von KCNQ2 und KCNQ3 wichtigen Strukturen zu erlangen. Für KCNQ2 sind weit über 20 Mutationen beschrieben, die im Zusammenhang mit „Benign familial neonatal convulsion“ stehen und sich über den gesamten Kanal verteilen. Für KCNQ3 jedoch sind insgesamt nur vier Mutationen bekannt, die zu Neugeborenenepilepsie führen. Keine dieser Mutationen befindet sich jedoch im Bereich der si-Domäne von KCNQ3. Daher erfolgte die Mutation der si-Domäne von Q1sidQ3 durch die für die si-Domäne von KCNQ1 im Zusammenhang mit dem *Romano-Ward Syndrom* beschriebenen Mutationen.

Durch die einzeln eingeführten Punktmutationen L533W, K544W, R555C, I566F, S587M, M589D, K591H und K594Q bei der Chimäre Q1sidQ3 mit dem Proteinrückgrat von KCNQ1 und der si-Domäne von KCNQ3, wie sie für Patienten mit einem *L-QT* Syndrom identifiziert wurden, kommt es jedoch nicht zu einer Aufhebung der Interaktion der durch Punktmutation veränderten Chimäre mit der si-Domäne von KCNQ3 und dem Rückgrat von KCNQ1 zusammen mit KCNQ2. Die Ströme der durch Punktmutation veränderten Kanäle von KCNQ1 mit der si-Domäne von KCNQ3 zusammen mit KCNQ2 sind für mit cRNA der beiden Kanäle injizierte Oozyten annähernd so groß, wie die Ströme der nicht mutierten KCNQ1/KCNQ3 Chimäre zusammen mit KCNQ2 und deutlich gegenüber den allein mit KCNQ2 injizierten *Xenopus* Oozyten erhöht.

Auch der Wegfall unterschiedlich großer Bereiche der si-Domäne von KCNQ3 hatte keinen Einfluss auf die gemessenen Ströme von KCNQ2 und den durch Deletion veränderten Chimären von KCNQ1 und KCNQ3. Aufgrund der Ergebnisse für die durch Punktmutation veränderten Chimären von Q1sidQ3, sowie der zusätzlichen Ergebnisse der durch Deletion im Bereich der si-Domäne von KCNQ3 verkürzten Chimären Q1sidQ3delta589, Q1sidQ3delta582 und Q1sidQ3delta575, wurde daher vermutet, dass die Interaktion der beiden  $\alpha$ -Untereinheiten KCNQ2 und KCNQ3 aufgrund der räumlichen dreidimensionalen Struktur und nicht auf vereinzelt interagierende Aminosäuren im Bereich der si-Domäne basiert.

#### **4.1.2 Funktion der zweiten coiled coil Domäne spannungsabhängiger KCNQ Kanäle**

Sequenzdatenanalysen ergaben für die carboxyterminal gelegene si-Domäne zwei hintereinander liegende putative coiled coil Domänen, von denen angenommen wurde, dass sie möglicherweise an der Assemblierung der KCNQ  $\alpha$ -Untereinheiten beteiligt sein könnten (Jenke et al., 2003).

Für die spannungsabhängigen Shaker-Kanäle, bei denen durch die Deletion der T1-Domäne die Fähigkeit zur Ausbildung von Homotetrameren nahezu verloren gegangen war, konnte durch das aminoternale Einfügen einer coiled coil Domäne eine erneute verstärkte tetramere Assemblierung dieser Kanäle beobachtet werden, so dass die coiled coil Domänen möglicherweise für einen erfolgreichen Zusammenbau von Kanälen verantwortlich sind (Minor et al., 2000; Zerangue et al., 2000).

Bekräftigt wird diese Vermutung durch Untersuchungen an den spannungsabhängigen ERG1 und EAG1 Kanälen (Jenke et al., 2003). ERG1 und EAG1 sind nicht in der Lage heteromere Kanäle zu bilden (Wimmers et al., 2001). Außerdem zeichnet sich ERG1 durch unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften im Vergleich zu den EAG1 Kanälen aus.

Jenke et al. haben den Bereich der coiled coil Domäne von ERG1 gegen die von EAG1 ausgetauscht. Der neu entstandene Kanal zeigte plötzlich neue Eigenschaften, sowohl die der ERG1, als auch die der EAG1 Kanäle, als Beweis, dass durch den Austausch der coiled coil Domänen nun doch eine Interaktion von ERG1 und EAG1 Kanälen möglich war. Anhand dieser Ergebnisse wurde daher auch von Jenke et al., 2003 vermutet, dass der für die Interaktion der Kanaluntereinheiten von EAG1 und ERG1 wichtige Bereich durch das Vorhandensein der jeweiligen coiled coil Domänen begründet wird.

Zur Überprüfung der Annahme, dass die beiden coiled coil Domänen der KCNQ Kanäle ebenfalls für die Assemblierung mehrerer Untereinheiten miteinander verantwortlich sind, wurden weitere Chimäre von KCNQ1 und KCNQ3 konstruiert, bei denen entweder nur die erste putative coiled coil Domäne, oder die zweite putative coiled coil Domäne, oder aber beide putativen coiled coil Domänen von KCNQ1 gegen die entsprechenden Aminosäuresequenzen von KCNQ3 ausgetauscht wurden.

Mit Hilfe elektrophysiologischer Untersuchungen an injizierten *Xenopus laevis* Oozyten und Koimmunpräzipitationsexperimenten mit KCNQ2FLAG und den HA markierten Chimären von KCNQ1 und KCNQ3 konnte gezeigt werden, dass die beiden coiled coil Domänen von KCNQ3 für eine Interaktion mit KCNQ2 zu dem heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Kanal

notwendig sind. Allerdings ergaben die elektrophysiologischen Untersuchungen unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die erste und die zweite coiled coil Domäne von KCNQ3.

Der Austausch der zweiten coiled coil Domäne von KCNQ1 gegen die zweite coiled coil Domäne von KCNQ3 führte in elektrophysiologischen Untersuchungen für den neu entstandenen chimären Kanal zu ähnlich verstärkten Strömen, wie sie auch für die beiden Wildtyp Kanäle KCNQ2 und KCNQ3 beobachtet werden konnten.

Auch das Einbringen der Porenmutation G314S für den chimären Kanal Q1(TCC2)Q3 mit der zweiten coiled coil Domäne von KCNQ3 und dem Proteinerückgrat von KCNQ1 hatte in Koinjektionsexperimenten einen dominant negativen Effekt auf die Ströme der mit KCNQ2FLAG injizierten *Xenopus* Oozyten, als Beweis für eine mögliche Interaktion dieses neu konstruierten Kanals mit KCNQ2FLAG. Untersuchungen zur Oberflächenexpression der Chimäre von KCNQ1 mit der zweiten coiled coil Domäne von KCNQ3 und KCNQ2HA ergaben ebenfalls vergleichbare Ergebnisse zu den beiden heteromer interagierenden Wildtypkanälen KCNQ2 und KCNQ3. Diese Bedeutung führt zu dem Schluss, dass die zweite coiled coil Domäne von KCNQ3 für sich allein ausreicht, um mit KCNQ2 zu interagieren. Des Weiteren konnte anhand des für KCNQ2 konstruierten und mutierten Kanals Q2(NT-TCC2), mit der aminoterminal liegenden zweiten coiled coil Domäne in Koinjektionsexperimenten mit *Xenopus* Oozyten gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen von der Position der zweiten coiled coil Domäne unabhängigen Effekt handelt. Dieses Ergebnis beweist, dass für eine verstärkte Interaktion von KCNQ2 und KCNQ3 die beiden coiled coil Domänen von KCNQ2 nicht in unmittelbarer Nähe zueinander stehen müssen.

Da der für den heteromeren Kanal von KCNQ2 und KCNQ3 verstärkte Strom gleichzeitig auf eine verstärkte Oberflächenexpression zurückzuführen ist, wie von Schwake et al., 2003 gezeigt werden konnte, besteht daher die Möglichkeit, dass durch eine Interaktion der beiden coiled coil Domänen von KCNQ2 und KCNQ3 ein putatives ER Retentionssignal aufgehoben wird. Vielleicht dient aber auch nur das Vorhandensein der zweiten coiled coil Domäne von KCNQ2, sowie der zweiten coiled coil Domäne von KCNQ3 als eine Art Transportsignal für einen verstärkten Transport zur Zelloberfläche, wie es auch von Kanki et al., 2004 beobachtet wurde.

Für die Gruppe der unspezifisch Kationen leitenden *Transient Receptor Potential* Kanäle, kurz *TRP* Kanäle, mit einem genau wie für die KCNQ Kanäle beschriebenen 6TM/1P Aufbau, konnte gezeigt werden, dass der Austausch der carboxyterminalen coiled coil Domäne für den TRPM8 Kanal gegen eine künstlich nach Harbury et al., 1993 konstruierte

coiled coil Domäne (GCN4-LI), nicht zu einer Assemblierung von *TRP*-Kanaluntereinheiten ausreicht (Tsuruda et al., 2006). Das Ergebnis überraschte, da die künstliche GCN4-LI coiled coil Domäne der Interaktionsdomäne des TRPM8 Kanals im Aufbau der helikalen Struktur ähnelte und genau wie der TRP Kanal hydrophobe Aminosäuren an Position a und d der durch eine Abfolge von insgesamt sieben Aminosäuren (abcdef<sub>n</sub>)  $\alpha$ -helikal gewundenen coiled coil Domäne (Harbury et al., 1993) besaß. Daneben befanden sich hydrophile Aminosäuren an Position b, c, e, f, g und h der stark spiralisierten GCN4-LI Interaktionsdomäne (Harbury et al., 1993). Auch für die TRPM8 Kanäle wird daher vermutet, dass die carboxyterminale TCC-Domäne nicht nur einfach der Verbindung von mehreren Unter-einheiten dient, sondern genauso einen Einfluss auf die Faltung und Reifung des Kanalproteins ausübt, indem die coiled coil Domänen eine mögliche Plattform für die Interaktion mit weiteren bisher unentdeckten und regulierend auf die Assemblierung von Kanälen wirkenden Proteinen bilden (Tsuruda et al., 2006). Diese Annahme wird durch zusätzliche Beobachtungen in Bezug auf weitere mögliche Funktionen von superspiralisierten coiled coil Domänen bekräftigt. So wird vermutet, dass für den Chaperone Co-Faktor Prefoldin, kurz PFD, und für die beiden AAA+ ATPasen ClpB und HslU, die am Abbau, sowie am Falten und Entfalten von Proteinen beteiligt sind, coiled coil Domänen die Interaktion mit nicht nativen Substratproteinen übernehmen (Martin et al., 2004).

### **4.1.3 Funktion der ersten coiled coil Domäne spannungsabhängiger KCNQ Kanäle**

Im Gegensatz zu den im Zusammenhang mit der zweiten coiled coil Domäne beschriebenen Ergebnissen zeigt die Chimäre von KCNQ1, bei der die erste coiled coil Domäne von KCNQ1 gegen die erste von KCNQ3 ausgetauscht wurde, keine verstärkten Ströme in elektrophysiologischen Untersuchungen mit KCNQ2FLAG koinjizierten *Xenopus* Oozyten. Auch das Einfügen der Porenmutation G314S hatte für mit KCNQ2FLAG koinjizierte *Xenopus* Oozyten nur einen leichten dominant negativen Effekt. Insgesamt besteht daher die Möglichkeit, dass die erste coiled coil Domäne von KCNQ3 daher keinen verstärkten Einfluss auf die heteromere Assemblierung mit KCNQ2 ausübt. Dennoch zeigen die Koimmunpräzipitationsexperimente, dass KCNQ2FLAG mit Hilfe von Q1(TCC1)Q3 präzipitiert werden kann.

Darüber hinaus führt der Wegfall der ersten coiled coil Domäne am C-Terminus für den mutierten Kanal von KCNQ2 mit der an den N-Terminus klonierten ersten coiled coil Domäne nicht zu verstärkten Strömen, wie sie für KCNQ2 und KCNQ3 beobachtet werden.



Die erste coiled coil Domäne scheint deshalb ebenfalls notwendig für die heteromere Assemblierung von KCNQ Kanälen.

Die Ergebnisse zeigen daher insgesamt, dass die zweite coiled coil Domäne einen verstärkten Einfluss auf die Heteromerisierung von KCNQ2 und KCNQ3 hat, wohingegen die erste coiled coil Domäne diesbezüglich eine untergeordnete Funktion einnimmt.

#### **4.1.4 Quervernetzungsexperimente zur Untersuchung der Homotetramerisierung von KCNQ2**

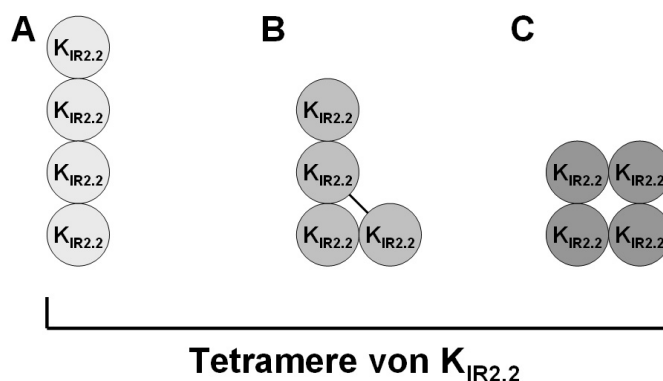
Alle bisher gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die für die Interaktion von KCNQ2 und KCNQ3, und mit sehr großer Wahrscheinlichkeit auch für die übrigen KCNQ Kanäle KCNQ1, KCNQ4 und KCNQ5, notwendigen Strukturen auf den Bereich der si-Domäne für die entsprechenden  $\alpha$ -Untereinheiten begrenzt sind. Aus diesem Grund wurde die gesamte 86 Aminosäuren große si-Domäne von KCNQ2 ab der Aminosäure V536 bis einschließlich I622 mit den beiden TCC-Domänen TCC1 und TCC2 in *E.coli* rekombinant hergestellt, um die homomere Assemblierung anhand der isolierten si-Domäne von KCNQ2 zu untersuchen.

Die Quervernetzungssubstanz DSS besitzt einen sehr geringen Durchmesser (11.4Å), so dass die beiden gleichgestalteten und für die Quervernetzung wichtigen reaktiven Zentren für die Bindung an freie primäre Amine nicht zu weit voneinander getrennt sind. Dabei ist die Bindung an die Quervernetzungssubstanz DSS durch die beispielsweise im Probenauftragspuffer befindlichen Reduktionsmittel  $\beta$ -Mercaptoethanol und Dithiothreitol nicht aufspaltbar. Für die Untersuchung der Wechselwirkung der superspiralisierten Interaktionsdomäne von KCNQ2 zeigte sich gerade der geringe Durchmesser als vorteilhaft. Eine Quervernetzung der gereinigten und in PBS-Puffer bei einem pH-Wert von 6.8 gelösten si-Domäne von KCNQ2 kann somit genau wie unter nativen Bedingungen nur zwischen den in Kontakt tretenden Aminosäuren zweier unterschiedlicher und benachbarter si-Domänen stattfinden, wie es auch die räumliche Struktur der fertig prozessierten Kanäle innerhalb der neuronalen Zelle zulässt. Für KCNQ4 konnte kürzlich die zweite si-Domäne gereinigt und proteinbiochemisch charakterisiert werden (Howard et al., 2007). Dort wurde anhand von chiraloptischen Spektren (Zirkulardichroismus) gezeigt, dass die gereinigte coiled coil Domäne TCC2 von KCNQ4 über einen großen Bereich bei unterschiedlichen pH-Werten von pH 3.0, pH 7.5 als auch bei pH 9.0 in  $\alpha$ -helikaler Struktur vorliegt, so dass dies auch für die aus Zelleinschlusskörpern von *E.coli* und bei einem pH Wert von 6.8 in PBS gelösten si-Domänen mit den beiden TCC-Domänen von KCNQ2 angenommen wurde.

Für die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen, rekombinant in *E.coli* exprimierten und anschließend aus Zelleinschlusskörpern aufgereinigten si-Domänen von KCNQ2 konnten durch unsere Arbeitsgruppe ebenfalls helikale Strukturen mittels CD-Spektralanalysen nachgewiesen werden (Wehling et al., 2007). Für die aus Zelleinschlusskörpern von *E.coli* gereinigte unveränderte si-Domäne von KCNQ2 konnte darüber hinaus durch unterschiedliche Einwirkzeiten mit DSS eine *in vitro* Quervernetzung des gereinigten Monomers, über die Bildung von Zwischenprodukten, wie dem Dimer, Trimer bis hin zum putativen Homotetramer unter Verwendung eines Hexa-Histidin Antikörpers in Western Blot Analysen nachvollzogen werden. Die Größe des beobachteten Monomers für die si-Domäne von KCNQ2 betrug 14,6kDa, die des Dimers entsprechend 29,2kDa, die des Trimers ungefähr 43,8kDa. Die Größe für das putative Tetramer hingegen wurde bei ungefähr 58,4kDa erwartet. Es wurde aber nur ein Signal bei ungefähr 70kDa beobachtet, so dass es sich bei dem beobachteten Signal auch um ein ungefähr 73kDa großes putatives Pentamer handeln könnte. Möglicherweise ist aber aufgrund der Verknüpfung von vier Monomeren Proteinen mit der si-Domäne von KCNQ2 das Laufverhalten für das resultierende putative Tetramer im hochprozentigen Polyacrylamidgel (18-20%) verändert.

Raab-Graham und Vandenberg konnten 1998 für die Familie der einwärts gleichrichtenden  $K_{IR}$ -Kaliumkanäle durch chemische Quervernetzungsexperimente mit Glutaraldehyd Erkenntnisse über die Stöchiometrie des aus dem Gehirn von Ratten separierten, endogenen  $K_{IR2.2}$  Kanals gewinnen. Demnach handelt es sich bei dem  $K_{IR2.2}$  Kanal um einen tetrameren Kaliumkanal. Die für den aus dem Gehirn gereinigten  $K_{IR2.2}$  Kanal beobachteten Größen betragen für das Monomer 56kDa, für das Dimer 122kDa und für das Trimer 188kDa. Nur für das putative Tetramer konnte nicht nur ein diskretes Signal, sondern drei verschiedene Signale mit einer Größe von 228kDa, 251kDa und 276kDa im Western Blot nachgewiesen werden. Raab-Graham und Vandenberg vermuteten, dass die verschiedenen Signale für den tetrameren  $K_{IR2.2}$  Kanal durch drei verschiedene Vernetzungsreaktionen zustande kamen, bei denen zum einen die einzelnen Monomere „perlenschnurartig“ hintereinander geheftet waren, zum anderen könnten die hintereinander gehefteten Monomere zusätzlich untereinander mit nicht direkt benachbarten Monomeren eine Verbindung eingehen und darüber hinaus ein in sich geschlossenes Tetramer bilden, bei dem alle Untereinheiten untereinander durch die Quervernetzungssubstanz Glutaraldehyd in Wechselwirkung treten (Abbildung 4.1).

Möglicherweise bietet die zuletzt genannte Hypothese eine Erklärung für ein verändertes Laufverhalten des putativen Tetramers im SDS-Polyacrylamidgel, so dass das in sich geschlossene tetramere Protein bestehend aus vier miteinander durch DSS vernetzte si-



**Abbildung 4.1:** Drei von Raab-Graham und Vandenberg, 1998 durch Quervernetzung mit Glutaraldehyd beschriebene mögliche Formen von K<sub>IR2.2</sub> Tetrameren, die allesamt ein unterschiedliches Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel zeigen. (A) Perlenkettenmodell, (B) Perlenschnurmodell. (C) Die durch Vernetzung von K<sub>IR2.2</sub> zuletzt entstehende in sich zu einem geschlossenen Tetramer vernetzte Struktur wandert nach Raab-Graham und Vandenberg am Schlechtesten durch das Polyacrylamidgel und steht demnach für das bei 276kDa beobachtete Signal des im Western Blot nachgewiesenen quervernetzten Tetramers.

Domänen von KCNQ2 daher langsamer durch die engen Maschen des hochprozentigen SDS-Polyacrylamidgels wandert und bei der durchgeführten Western Blot Analyse ein Signal bei ungefähr 65kDa bis 70kDa für das in sich geschlossene Tetramer ergibt und nicht wie erwartet bei lediglich 58,4kDa zeigt. Die weiteren für K<sub>IR2.2</sub> beobachteten Signale für die hintereinander perlenschnurartig vernetzten Monomere könnten unter Umständen aufgrund sterischer Besonderheiten der stark spiralisierten Wechselwirkungsdomäne der untersuchten KCNQ Kanäle nicht ausgebildet werden und wurden deshalb nicht in den Western Blot Analysen beobachtet.

#### 4.1.5 Multimerisierung von KCNQ Kanälen nach Aufhebung der coiled coil Domänen

Des weiteren wurde untersucht wie sich die Aufhebung der „coiled coil“ Struktur durch den Austausch der beiden Leucine an den Positionen 585 und 637 von KCNQ2 gegen die Aminosäure Prolin für den Bereich der ersten und der zweiten TCC-Domäne auf die Quervernetzung mit DSS auswirkt. Lupas et al. haben 1991 einen Algorithmus, sowie das Computerprogramm COILS Version 2.2 entwickelt, mit dem Vorhersagen über die Ausbildung einer „coiled coil“ Struktur getroffen werden können. Der Austausch der beiden Leucine zu Prolinen sollte demnach zu einer Aufhebung der superspiralisierten Struktur der beiden coiled coil Domänen von KCNQ2 führen. In einem vergleichenden und parallel durchgeführten Experiment wurden gleiche Mengen der aus Zelleinschlusskörpern von *E.coli* gereinigten unveränderten si-Domäne von KCNQ2, sowie der durch die beiden Punktmutationen L585P und L637P veränderten si-Domäne von KCNQ2 mit Hilfe von DSS

unter denselben Versuchsbedingungen untersucht. Für die unveränderte si-Domäne von KCNQ2 konnten in der darauffolgenden Western Blot Analyse dieselben wie bereits zuvor beobachteten Signale für das Monomer, das putative Dimer, das putative Trimer, sowie für das putative Tetramer bzw. Pentamer nachgewiesen werden. Im Unterschied zu der unveränderten si-Domäne zeigte sich jedoch für die durch Punktmutation veränderte si-Domäne von KCNQ2 im Western Blot hauptsächlich ein starkes Signal für das Monomer und nur ein schwaches Signal für ein putatives Dimer, jedoch keine weiteren Signale für etwa ein putatives Trimer, oder aber ein putatives Tetramer bzw. Pentamer. Es wurde daher vermutet, dass die Aufhebung der hochgradig helikal spiralisierten räumlichen Struktur der beiden coiled coil Domänen TCC1 und TCC2 von KCNQ2 gleichzeitig zu einer Aufhebung der möglichen Interaktion von KCNQ Untereinheiten untereinander führt. Dass dennoch ein schwaches Signal für das putative Dimer nach dem Quervernetzen der durch Punktmutation veränderten si-Domäne von KCNQ2 beobachtet werden konnte, kommt möglicherweise dadurch zustande, dass die homobifunktionale und mit freien primären Aminen reagierende Quervernetzungssubstanz DSS mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit die beiden aminoterminalen Bereiche zweier auch durch Punktmutation veränderter si-Domänen von KCNQ2 miteinander verbinden kann. Sicherlich würden dann in einem geringen Umfang ebenfalls weitere Proteine mit der durch Punktmutation veränderten si-Domäne von KCNQ2 zu Trimeren, Tetrameren und weiteren Multimeren miteinander vernetzt werden, diese Multimere konnten jedoch nicht im Western Blot unter den eingestellten Bedingungen beobachtet werden.

Darüber hinaus zeigen die Untersuchungen von Wehling et al., 2007, dass das gereinigte rekombinante Protein mit der si-Domäne von KCNQ2 zu einer Tetramerisierung befähigt ist und dass das Einfügen der Doppelmutation L585P und L637P zu einer Abnahme der helikalen Struktur im CD-Spektrum führt. Darüber hinaus konnte von Wehling et al. ebenfalls für die durch die beiden Mutationen L585P und L637P veränderte si-Domäne von KCNQ2 durch Größenausschluß-Chromatographie eine Dimerisierung beobachtet werden, was mit den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen für die Quervernetzungsexperimente mit DSS übereinstimmt.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass für eine erfolgreiche Interaktion mehrerer KCNQ2 Monomere (Lupas, 1996; Sönding und Lupas, 2003) die Ausbildung der superspiralisierten dreidimensionalen Struktur der „coiled coils“ notwendig ist. Eine Veränderung dieser helikalen Struktur führt vermutlich zu einer Aufhebung der Wechselwirkung von KCNQ Untereinheiten untereinander, wie es auch von Schwake et al., 2006 in elektro-

physiologischen Untersuchungen anhand von injizierten *Xenopus laevis* Oozyten für die durch Punktmutation veränderten beiden coiled coil Domänen TCC1 und TCC2 von KCNQ2 und KCNQ3 beobachtet wurde.

#### **4.1.6 N-Glykosylierung von KCNQ1**

Eine genauere Untersuchung der Assemblierung von KCNQ2 und KCNQ3 sollte mit Hilfe der zuvor klonierten Chimären von KCNQ1 und KCNQ3 unter Einbeziehung der für KCNQ1 beschriebenen N-Glykosylierung erfolgen (Barhanin et al., 1996 ; Freeman et al., 2000). Für KCNQ1 konnten für Membranpräparationen aus dem Atrium, dem ventriculären Endocardium und dem Epicardium des Pferdeherzens in Experimenten mit und ohne N-Glykosidase F zwei Formen, eine N-glykosylierte (75kDa) und eine deglykosylierte Form (60kDa) nachgewiesen werden (Finley et al., 2002).

Die Modifikation von Proteinen mit einer N-Glykosylierungsstelle geschieht im Endoplasmatischen Retikulum und wird durch eine Oligosaccharyltransferase vermittelt (Yan und Lennarz, 2005). Falls die zweite coiled coil Domäne für einen verstärkten Transport der heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Kanäle verantwortlich ist, dann sollten wesentlich mehr der glykosylierten chimären Proteine mit der zweiten coiled coil Domäne von KCNQ3 an der Zelloberfläche von transfizierten Zellen zu finden sein, als für die zusammen mit KCNQ1 und KCNQ2 transfizierten COS-7 Zellen, da KCNQ1 nicht mit KCNQ2 heteromere KCNQ Kanäle bildet. Als Beweis für den verstärkten Transport könnte zusätzlich ein Western Blot dienen, bei dem die Menge der glykosylierten Membranproteine für die zusammen mit KCNQ2 kotransfizierten Chimären von KCNQ1 und KCNQ3 gegen die Menge der glykosylierten Kanäle von KCNQ1 für die zusammen mit KCNQ2 transfizierten COS-7 Zellen verglichen wird.

Gleichzeitig könnten durch die Verwendung der Endoglykosidase H (Endo H) Untersuchungen zum Transport der N-glykosylierten Chimären aus dem ER in den Golgi Apparat stattfinden. Im ER geschieht das Anfügen von Zuckern mit einem verstärktem Anteil an Mannose. Diese Mannose Zuckerreste können durch Endo H entfernt werden (Nagaya und Papazian, 1997). Hingegen erfolgt der Austausch gegen komplexere Zuckerreste mit beispielsweise Sialinsäuren im Golgi Apparat (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Diese komplexen Zucker können nicht mehr mit Endo H entfernt werden. Jedoch führt eine Behandlung mit PNGase F zur Entfernung aller an Asparagin geknüpften Zuckerreste.

Weder die mit einer HA Erkennungssequenz versehene Chimäre von KCNQ1 und KCNQ3, mit der si-Domäne von KCNQ3, noch die weiteren Chimären von KCNQ1 und KCNQ3 mit entweder nur der ersten oder aber nur der zweiten coiled coil Domäne von KCNQ3 zeigten nach Behandlung mit N-Glykosidase F Lösung, Unterschiede im Vergleich zu den nicht mit PNGase F behandelten Proben für die im Anschluss durchgeführte Western Blot Analyse. Für die aminoterminal oder carboxyterminal HA markierten Kanäle von KCNQ1 konnte ebenfalls keine Veränderung nach Behandlung mit PNGase F beobachtet werden. Auch der carboxyterminal HA markierte und im Bereich der N-Glykosylierungsstelle durch eine Punktmutation veränderte Kanal von KCNQ1-N289A zeigte keine andersartigen Signale im Western Blot im Vergleich zu den entweder amino- oder auch carboxyterminal HA markierten Kanälen von KCNQ1. Da sich aber für die gleichzeitig mit PNGase F behandelte Probe von LAMP2a im Gegensatz zu der unbehandelten Probe von LAMP2a zwei unterschiedliche verlaufende Signale im Western Blot ergeben, ist es wahrscheinlich, dass erstens eine Glykosylierung in der verwendeten Zelllinie COS-7 grundsätzlich möglich ist und dass die für die einwandfreie Wirkung der PNGaseF *in vitro* gewählten Versuchsbedingungen generell eine DeGlykosylierung von Proteinen erlaubt. Das Lysosomen assoziierte Membranprotein 2a -LAMP2a- besitzt aber im Gegensatz zu KCNQ1 mit nur einer N-Glykosylierungsstelle eine Reihe weiterer N-Glykosylierungsstellen (Cuervo und Dice, 2000), so dass das Vorhandensein nur einer N-Glykosylierungsstelle möglicherweise nicht zu einer Veränderung der Größe der beobachteten Proteine in der anschließenden Western Blot Analyse führt.

Darüber hinaus handelt es sich bei dem von Finley et al., 2002 untersuchten KCNQ1 um einen endogen aus dem Herzen des Pferdes präparierten Kanal, und nicht wie im vorliegenden Fall um ein künstlich, in der aus der afrikanischen grünen Meerkatze *Cercopithecus aethops* isolierten COS-7 Zelllinie, überexprimiertes Protein von *homo sapiens*. Möglicherweise werden zur Modifikation von KCNQ1 daher im Herzen zusätzliche Faktoren und Enzyme benötigt, die in COS-7 Zellen nicht vorhanden sind.

Insgesamt konnte daher eine mögliche Modifikation durch N-Glykosylierung und unterschiedlich große Signale für KCNQ1 im Western Blot, wie sie von Finley et al., 2002 beschrieben wurden, nicht beobachtet werden.

Interessanterweise zeigten aber alle carboxyterminal markierten Chimäre von KCNQ1 und KCNQ3, Q1sidQ3HA, Q1(TCC1)Q3HA und Q1(TCC2)Q3HA, sowie der carboxyterminal HA markierte Kanal von KCNQ1, auffällige diskrete Signale im Western Blot bei einer Größe von ungefähr 40kDa. Der um insgesamt 25 Aminosäuren größere chimäre Kanal von

KCNQ1 und KCNQ3 -Q1siDQ3HA- zeigte das auffällige Signal ebenfalls, jedoch um einige kDa größer, so dass vermutet wird, dass es sich bei dem im Western Blot beobachteten Signal um ein spezifisches putatives Abbauprodukt von KCNQ1 handelt. Die Tatsache, dass der aminoterminal HA markierte Kanal von KCNQ1 dieses spezifische Signal bei 40kDa nicht erkennt, deutet zusätzlich darauf hin, dass es sich bei dem spezifisch auftretenden Artefakt um einen Teil des carboxyterminal HA markierten Bereiches von KCNQ1 handelt. Aufgrund der diskreten Bande ist das im Western Blot detektierte Signal daher möglicherweise ein Abbauprodukt wie es auch bei der Prozessierung durch Proteasen, beispielsweise den Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen ADAMs, im Wege der Signaltransduktion entsteht (Maretzky et al., 2005). Weitere Untersuchungen sind daher für eine genaue Aussage über die Bedeutung und mögliche Funktion des im Western Blot identifizierten spezifischen Signals von KCNQ1 notwendig.

#### **4.1.7 Putative PKA abhängige Phosphorylierung von KCNQ5**

Modifikationen, beispielsweise durch Glykosylierungen aber auch das Anfügen von zusätzlichen Phosphatresten, können die Struktur und Funktion von Proteinen beeinflussen. Für die KCNQ Kanäle sind bereits eine Reihe von Phosphorylierungen beschrieben, die durch eine Vielzahl an unterschiedlichen Kinasen, aber auch Phosphatasen gesteuert werden und die einen direkten Einfluss auf die physiologischen Eigenschaften der untersuchten KCNQ  $\alpha$ -Untereinheiten ausüben. Beispielsweise erfolgt unter Mitwirkung eines als Anker dienenden Proteins AKAP150 eine Phosphorylierung von KCNQ2 mit Hilfe der Protein Kinase C (PKC). Für superiorcervicalganglische (SCG) Neuronen der Ratte konnte gezeigt werden, dass die PKC abhängige Phosphorylierung des heteromeren Kanals bestehend aus KCNQ2 und KCNQ3 zu einer Inhibierung des resultierenden M-Stroms führt, ähnlich der Wirkung der Muskarin abhängigen Inhibierung (Hoshi et al., 2003).

Im Gegensatz zu der für die PKC beobachteten inhibitorischen Wirkung auf KCNQ2 kann über das als Anker dienende Protein Yotiao eine PKA abhängige Phosphorylierung von KCNQ1 über den Serinrest an Position S27 erfolgen, die sich stimulierend auf die in Herzmuskelzellen gemessenen Ströme auswirkt (Marx et al., 2002). Auch für KCNQ2 konnte eine PKA abhängige Phosphorylierungsstelle an Position S52 identifiziert werden, deren Phosphorylierung zu einer Erhöhung des gemessenen Stroms für den heteromeren Kanal von KCNQ2 und KCNQ3 in transfizierten HEK293 Zellen führt (Schroeder et al., 1998). Für KCNQ5 wurde ebenfalls eine putative Phosphorylierungsstelle mit der Konsensussequenz

VLRKGS an Position S600 beschrieben, jedoch nicht weiter charakterisiert (Schroeder et al., 2000). Interessanterweise befindet sich diese für KCNQ5 beschriebene putative Phosphorylierungsstelle unmittelbar zwei Aminosäuren carboxyterminal der zweiten coiled coil Domäne TCC2 von KCNQ5 gelegen, weswegen vermutet wurde, dass eine mögliche Phosphorylierung des Serins an Position S600 einen Einfluss auf die Assemblierung oder den Transport des homomeren Kanals von KCNQ5 und auch auf den heteromeren Kanal bestehend aus KCNQ3 und KCNQ5 ausüben könnte.

Für detaillierte Untersuchungen über die Funktion dieser putativen Phosphorylierungsstelle wurde cRNA von KCNQ5, sowie die durch Punktmutation veränderten Kanäle von KCNQ5, in *Xenopus* Oozyten injiziert und mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode untersucht. Die erste veränderte Punktmutante von KCNQ5, S600A zeigte im Vergleich zum unveränderten Kanal von KCNQ5 geringere Ströme. Da eine PKA abhängige Phosphorylierung von KCNQ1 und KCNQ2 zu erhöhten Strömen führte, war es nicht weiter erstaunlich, dass eine Veränderung der Phosphorylierungsstelle von KCNQ5 für die mögliche Bindung eines Phosphatrestes, gleichsam zu einer Erniedrigung des gemessenen Stroms für den durch Punktmutation veränderten Kanal KCNQ5-S600A in elektrophysiologischen Messungen nach der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode führte. Der Austausch des Serinrestes an Position S600 gegen ein negativ geladenes Glutamat sollte die Wirkung einer möglichen Phosphorylierung imitieren, da durch eine Phosphorylierung der modifizierten Aminosäure eine negative Nettoladung zugeteilt wird. Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch des Serins an Position S600 gegen ein negativ geladenes Glutamat zu einer Erhöhung des gemessenen Stroms im Vergleich zum unveränderten Kanal von KCNQ5 führt, was ein erstes Indiz für eine mögliche PKA abhängige Phosphorylierung darstellt. Dieselbe Tendenz konnte in Koinjektionsversuchen für die resultierenden heteromeren Kanäle von KCNQ5, sowie den beiden durch die Punktmutation S600A oder S600E mutierten Kanälen von KCNQ5 mit KCNQ3 beobachtet werden, so dass sich eine putative Phosphorylierung von KCNQ5 ebenfalls auf die im Gehirn vorkommenden heteromeren Kanäle von KCNQ5 mit KCNQ3 und damit auf den M-Strom auswirken könnte. Eine im Anschluss zu den elektrophysiologischen Experimenten durchgeführte Western Blot Analyse, ergab für den durch Punktmutation S600A veränderten Kanal von KCNQ5, im Vergleich zu den beiden weiteren Kanälen KCNQ5 und KCNQ5-S600E, ein deutlich schwächeres Signal. Der unveränderte Kanal von KCNQ5 unterschied sich nicht sehr deutlich von dem Signal von KCNQ5-S600E, wenngleich das Signal für KCNQ5-S600E am stärksten war. Dieselbe Tendenz ergab sich für die drei untersuchten KCNQ5 Kanäle, Wildtyp



KCNQ5, KCNQ5-S600A und KCNQ5-S600E in Koinjektionsexperimenten mit KCNQ3. Eine putative Phosphorylierung von KCNQ5 führt daher zu einem möglicherweise verstärkten *gating*, dem Passieren von Kaliumionen durch die Pore des Kanals, zum anderen eventuell zu einer erhöhten Expression und gleichzeitig zu einer gesteigerten Assemblierung sowohl der homotetrameren Kanäle von KCNQ5 als auch der heteromeren Kanäle von KCNQ5 und KCNQ3.

Unterstützt wird diese Vermutung anhand von Untersuchungen zur PKA abhängigen Phosphorylierung des weiteren Kaliumkanals ROMK, auch als  $K_{IR1.1}$ , bezeichnet (O'Connell et al., 2005). Für ROMK-Kanäle konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung der putativen Phosphorylierungsstelle an Position S44 der Aminosäureabfolge zu einem Alanin gleichzeitig zu einer Abnahme des im Western Blot beobachteten Signals im Vergleich zum unveränderten ROMK-Kanal führt. Außerdem hatte die Punktmutation S44A eine Abnahme des gemessenen Stroms im Vergleich zu dem unveränderten ROMK Kanal zur Folge. Hingegen führte der Austausch des Serinrestes gegen einen negativ geladenen Aspartatrest zu einer Zunahme, sowohl der in *Xenopus* Oozyten gemessenen Ströme, als auch der Signale für die im Anschluss durchgeführte Western Blot Analyse im Vergleich zu den Messungen für den unveränderten ROMK-Kanal. O'Connell et al. vermuteten, dass eine Phosphorylierung des ROMK-Kanals zu einer Unterdrückung eines putativen ER-Retentionssignals führt und dass dadurch eine gesteigerte Oberflächenexpression erreicht wird.

<b>KCNQ4</b> (SGK1-Bindestelle)	439	<b>R</b>	<b>I</b>	<b>R</b>	<b>M</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>P</b>	451
	1315	5'-CGC ATC CGC ATG GGC AGC TCC CAG CGG CGG ACG GGT CCT -3'													1353
<b>KCNQ5</b> (putative PKA-Bindestelle)	595	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>K</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>A</b>	607
	1783	5'-GTC CTT CGG AAA GGC TCT GCC TCA GCC CTC GCT TTG GCT -3'													1821
<b>ROMK</b> (PKA-Bindestelle)	39	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>C</b>	<b>N</b>	<b>I</b>	51
	114	5'-AGA GCA AGG CTA GTC TCC AAA GAT GGA AGG TGC AAC ATA -3'													152

**Abbildung 4.2: Sequenzdatenvergleich der SGK1 Bindestelle von KCNQ4 mit der PKA Phosphorylierungsstelle von ROMK und der putativen PKA Bindestelle von KCNQ5.** Gezeigt wurde der Bereich für die von Seeböhm et al., 2005a beschriebene SGK1 Bindestelle von KCNQ4. Darunter befindet sich der Bereich, der von Schroeder et al., 2000 als putative PKA Bindestelle beschrieben wurde, sowie die für ROMK identifizierte PKA Phosphorylierungsstelle S44 (O'Connell et al., 2005). Die Serinereste, für KCNQ4 S444, für KCNQ5 S600 und für ROMK S44, die als mögliche Phosphorylierungsstellen in Betracht kommen, sind in schwarz hervorgehoben. Zur besseren Übersicht befindet sich jeweils unterhalb der Proteinsequenz von KCNQ4, KCNQ5 und ROMK das dazugehörige DNA-Basentriplett.

PKA abhängige *in vitro* Phosphorylierungsexperimente mit KCNQ1 und KCNQ5 ergaben nur für KCNQ1 eine sichtbare Phosphorylierung. Für KCNQ5 hingegen konnte kein Signal durch

Autoradiographie mit radioaktivem Phosphat (P-32) beobachtet werden. Möglicherweise wird KCNQ5 deshalb gar nicht wie vermutet PKA abhängig phosphoryliert, oder aber andere Serin abhängige Kinasen, die hier nicht genauer untersucht wurden, beispielsweise die Serum- und Glucocorticoidinduzierbare Kinase SGK1, sind verantwortlich für eine putative Phosphorylierung von KCNQ5.

Für die Serum- und Glucocorticoidinduzierbaren Kinasen konnte bewiesen werden, dass eine SGK abhängige Phosphorylierung zu einer erhöhten Oberflächenexpression von Transportproteinen und auch Ionenkanälen führt (Pearce, 2003; Verrey et al., 2003; Flores et al., 2003). KCNQ4 ist der erste spannungsabhängige Kaliumkanal, für den gezeigt werden konnte, dass die Serum- und Glucocorticoidinduzierbare Kinase SGK1 einen stimulierenden Effekt auf den in *Xenopus* Oozyten gemessenen Strom ausübt (Seebohm et al., 2005a). Eine Punktmutation des Serins an Position S444A für die identifizierte SGK Konsensussequenz IRMGS444 führte zu einer Abnahme der stromverstärkenden Wirkung der SGK1 in mit cRNA von KCNQ4 injizierten *Xenopus* Oozyten. Die Abbildung 4.2 zeigt einen Vergleich der für KCNQ4 beschriebenen SGK1 beschriebenen Phosphorylierungsstelle mit der von Schroeder et al., 2000 identifizierten putativen PKA abhängigen Phosphorylierungsstelle, sowie der für ROMK identifizierten PKA abhängigen Phosphorylierungsstelle.

#### **4.1.8 Stromverstärkender Effekt der Porenregion von KCNQ1 (PQ1) und des C-Terminus von KCNQ3**

Homotetramere KCNQ1 und KCNQ2 Chimären mit dem gesamten C-Terminus von KCNQ3 zeigten insgesamt verstärkte Ströme im Vergleich zu den unveränderten Kanälen von KCNQ1 und KCNQ2 allein (Maljevic et al., 2003). Als Ursache für die beobachteten erhöhten Ströme der von Maljevic et al., 2003 beschriebenen chimären Kanäle von KCNQ1 und KCNQ2 mit dem carboxyterminalen Bereich von KCNQ3 wurde eine mögliche stärkere Oberflächenexpression oder eine mögliche Inhibierung eines putativen ER-Retentionssignals vermutet, wie es auch von Schwake et al., 2000 und 2003 angenommen wurde. Darüber hinaus wurde ebenso vermutet, dass eine erhöhte Einzelkanalleitfähigkeit, sowie eine mögliche erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der chimären Kanäle von KCNQ1 und KCNQ2 mit dem carboxyterminalen Ende von KCNQ3 Ursache für die erhöhten gemessenen Ströme sein könnte. Untersuchungen von Schwake et al., 2000 widersprechen aber diesen Vermutungen. Danach unterscheiden sich die Einzelkanalleitfähigkeiten und die Offenwahrscheinlichkeiten sowohl der homo- als auch der heterotetrameren Kanäle von KCNQ2 und KCNQ3 nicht

wesentlich voneinander. Interessanterweise kann der für die Amplitude der Ströme verstärkende Effekt der KCNQ1 und KCNQ2 Chimären mit dem carboxyterminalen Bereich von KCNQ3 nicht für den homotetrameren Kanal von KCNQ3 beobachtet werden. KCNQ3 selbst zeigt in elektrophysiologischen Untersuchungen nur Ströme mit einer geringen Amplitude im Vergleich zu den übrigen  $\alpha$ -Untereinheiten KCNQ1, KCNQ2, KCNQ4 und KCNQ5.

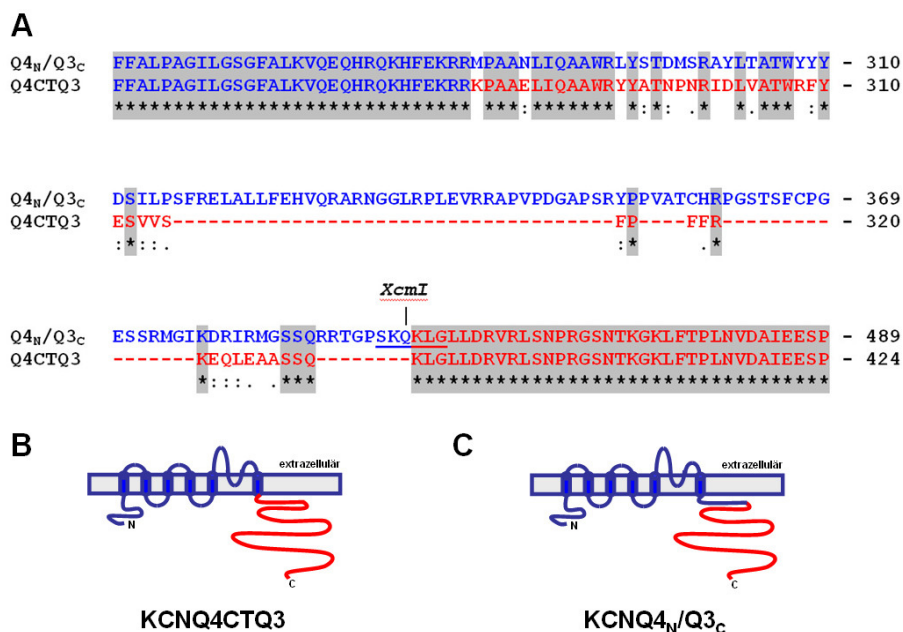
Für KCNQ3 wurden im Rahmen der Untersuchung über die Wirkung von Retigabin auf die bekannten KCNQ Kanäle von Schenzer et al., 2005 weitere Chimären von KCNQ1 und KCNQ3 konstruiert, die, für sich allein in *Xenopus* Oozyten exprimiert, erhöhte Ströme im Vergleich zu nur mit KCNQ3 injizierten *Xenopus* Oozyten ergaben. Diese Chimären enthielten die Porenregion von KCNQ1 mit der darin befindlichen N-Glykosylierungsstelle im Bereich der Turret Domäne. Es wurde daher vermutet, dass eventuell eine N-Glykosylierung von KCNQ1 einen verstärkenden Effekt auf die resultierenden Ströme ausübt. Möglicherweise führt aber zusätzlich die Inhibierung einer putativen Wechselwirkung zwischen dem C-Terminus und der Porenregion von KCNQ3 zu den beobachteten verstärkten Strömen der sowohl für von Maljevic et al., 2003, als auch von Schenzer et al., 2005 untersuchten chimären Kanäle von KCNQ3.

Untersuchungen von Etxeberria et al., 2004 verstärken dabei die Annahme, dass die Porenregion von KCNQ3 regulierend auf den Kanal von KCNQ3 wirkt. Es wird von Etxeberria et al. vermutet, dass der Alaninrest an Position A315 im Bereich der Porenregion von KCNQ3 für die nur geringen Ströme von KCNQ3 verantwortlich ist und dass um den Alaninrest A315 eine Art Tasche für die Bindung mit einem putativen und noch unbekanntem Inhibitor vorhanden ist. Für den heteromeren Kanal von KCNQ2 und KCNQ3 tritt demnach der für KCNQ3 inhibierende Effekt nicht in Erscheinung, da durch die Vereinigung von KCNQ2 und KCNQ3 der regulierende Effekt des Alaninrestes A315 durch die entsprechende Aminosäure T276 von KCNQ2 aufgehoben wird. Etxeberria et al. nahmen weiterhin an, dass der aminoterminaler Bereich von KCNQ2 und KCNQ3 Einfluss auf die maximale Offenwahrscheinlichkeit der homotetrameren Kanäle ausübt und dass das carboxyterminale Ende generell verantwortlich für die unterschiedliche Oberflächenexpression der KCNQ Kanäle ist. Für die Untersuchung der stimulierenden Wirkung der Porenregion von KCNQ1, sowie der ebenfalls Strom verstärkenden Wirkung des carboxyterminalen Endes wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe von Chimären hergestellt. Für Chimäre von KCNQ4 zeigte sich, dass der Austausch der Porenregion von KCNQ4 gegen die Porenregion von KCNQ1 zu einem etwa doppelt so starken Strom im Vergleich zum unveränderten Kanal von KCNQ4 führt.

Einen ebenfalls stimulierenden Effekt hatte der Austausch der Porenregion von KCNQ1 gegen die Porenregion von KCNQ2, sowie gegen die Porenregion von KCNQ5. Jedoch führt der Austausch der Porenregion von KCNQ5 gegen die Porenregion von KCNQ1 nicht zu einer erhöhten Produktion des mutierten Kanals für transfizierte COS-7 Zellen, so dass der für die Porenregion von KCNQ1 beobachtete stimulierende Effekt tatsächlich auf andere veränderte Eigenschaften, wie etwa einer erhöhten Einzelkanalleitfähigkeit oder einer veränderten Offenwahrscheinlichkeit zurückzuführen ist.

Der Austausch des carboxyterminalen Bereiches von KCNQ4 gegen den C-Terminus von KCNQ3 führte für die Chimäre von KCNQ4 ebenfalls zu erhöhten Strömen für mit cRNA injizierte *Xenopus* Oozyten. Wobei dieser beobachtete Effekt vermutlich eher auf eine, genau wie für die von Schwake et al. 2003 untersuchte Chimäre mit der si-Domäne von KCNQ3 und den Proteinrückgrat von KCNQ1, erhöhte Oberflächenexpression und nicht auf eine veränderte Offenwahrscheinlichkeit zurückzuführen ist. Interessanterweise zeigte eine von Li et al., 2004 konstruierte Chimäre von KCNQ4 und dem carboxyterminalen Bereich von KCNQ3 mit der Bezeichnung KCNQ4<sub>N</sub>/3<sub>C</sub> nur sehr geringe Ströme in CHO-Zellen, die in ihrer Amplitude deutlich unter denen von KCNQ3 lagen.

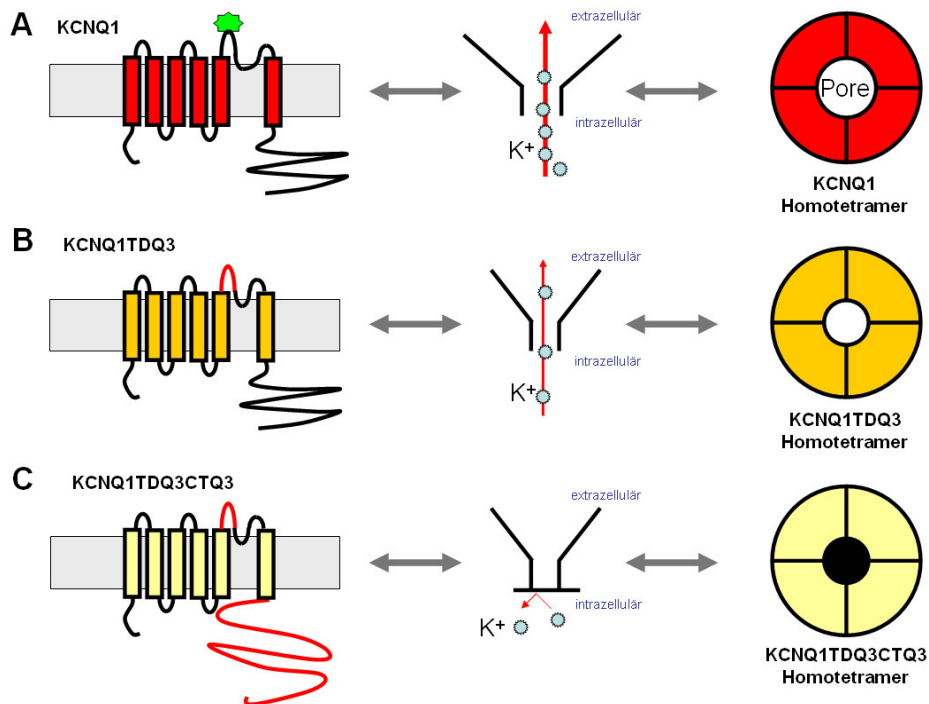
Wie sich zeigte, unterscheidet sich jedoch die von Li et al., 2004 konstruierte Chimäre von KCNQ4 und KCNQ3 in mehreren Punkten von der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Chimäre KCNQ4CTQ3 mit den Proteinrückgrat von KCNQ4 und dem C-Terminus von KCNQ3. Der Austausch des carboxyterminalen Bereiches von KCNQ4 gegen den C-Terminus von KCNQ3 erfolgte bei Li et al., 2004 durch die Verwendung des für beide Kanäle vorkommenden Restriktionsenzym *XcmI*. Jedoch schneidet *XcmI* an unterschiedlichen Stellen des C-Terminus von KCNQ4 und KCNQ3, so dass zum einen kein homologer Austausch von Aminosäuren stattfand und zum anderen der von Li et al. beschriebene chimäre Kanal zusätzlich um fünfundsechzig Aminosäuren größer ist, als der für diese Arbeit untersuchte chimäre Kanal KCNQ4CTQ3. Zudem erfolgte bei Li et al., 2004 der Austausch deutlich carboxyterminal der sechsten Transmembrandomäne hinter der von Gamper et al., 2005 charakterisierten Calmodulin Andockstelle von KCNQ4, hingegen wurde für die hier untersuchte Chimäre von KCNQ4 mit dem C-Terminus von KCNQ3 nach dem Vorbild von Maljevic et al., 2003 direkt hinter der sechsten Transmembrandomäne S6 mittels Fusions-PCR ein homologer Austausch der Aminosäureabfolge von KCNQ4 gegen die entsprechende Sequenz von KCNQ3 durchgeführt (Abbildung 4.3). Daher lassen sich die von Li et al., 2004 beschriebenen Ergebnisse nicht direkt mit den hier gefundenen Beobachtungen vergleichen.



**Abbildung 4.3:** (A) Sequenzdatenvergleich der Chimäre KCNQ4CTQ3 mit der von Li et al., 2004 konstruierten Chimäre Q4<sub>N</sub>/Q3<sub>C</sub>. Die CLUSTALW Analyse erfolgte unter Verwendung des frei im Internet (<http://www.ebi.ac.uk/>) erhältlichen Computerprogramms CLUSTALW (1.83) des Europäischen Bioinformatik Instituts (EBI), das dem Europäischen Molekularbiologie Laboratorium (EMBL) unterstellt ist. In blau gedruckte Aminosäuren stehen für Bereiche von KCNQ4. Hingegen sind die zu KCNQ3 gehörigen Aminosäuren in rot abgebildet. Die grauen Kästchen zeigen für die beiden untersuchten Chimären KCNQ4 und Q4<sub>N</sub>/Q3<sub>C</sub> übereinstimmende Sequenzen, die zusätzlich unterhalb der Sequenzen mit einem Sternchen markiert sind. Mit einem Doppelpunkt wurden Bereiche hervorgehoben, die zwar von ihrer Aminosäuresequenz nicht identisch sind, deren Aminosäuren aber vergleichbare Eigenschaften, wie Ladung und Hydrophobizität aufweisen. Die Punkte unter den Sequenzen hingegen verdeutlichen semikonservative Aminosäureabfolgen. Ist unter den aufgeführten Aminosäuresequenzen eine Lücke, so stimmen die untersuchten Sequenzen weder in der Abfolge noch in der Ladung oder Hydrophobizität überein. Der Bereich der *XcmI* Restriktionsschnittstelle wurde zudem unterstrichen. (B) Schematische Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Chimäre KCNQ4CTQ3 und (C) der von Li et al., 2004 konstruierten Chimäre Q4<sub>N</sub>/Q3<sub>C</sub>.

Möglicherweise ist jedoch der von Li et al., 2004 nicht ausgetauschte Bereich ab der sechsten Transmembrandomäne von KCNQ3 bis zur *XcmI* Restriktionsschnittstelle verantwortlich für die erhöhte Oberflächenexpression von Chimären mit dem C-Terminus von KCNQ3.

Untersuchungen der weiteren Chimären von KCNQ1 und KCNQ3, bei der zum einen die Porenregion von KCNQ1 gegen die Porenregion von KCNQ3 ausgetauscht wurde, zeigen eine Verringerung des gemessenen Stroms für den chimären Kanal KCNQ1TDQ3 im Vergleich zum unveränderten Kanal von KCNQ1, mit ähnlich geringer Amplitude wie für den homotetrameren Kanal von KCNQ3. Der Austausch des carboxyterminalen Bereiches von KCNQ1 gegen den carboxyterminalen Bereich von KCNQ3 verstärkt sogar noch den inhibierenden Einfluss der Turret Domäne von KCNQ3 für KCNQ1TDQ3CTQ3. Gleichzeitig wird der durch die N-Glykosylierungsstelle im Bereich der Turret Domäne von KCNQ1 vermittelte mögliche stimulierende Effekt auf KCNQ1 aufgehoben.



**Abbildung 4.4:** Einfluss der Porenregion von KCNQ1, der Turret domain von KCNQ3, sowie des C-Terminus auf die untersuchten Chimären von KCNQ1 und KCNQ3. (A) Die Porenregion von KCNQ1 mit N-Glykosylierungstelle (grün) führt möglicherweise zu einem verstärkten Öffnen des homotetrameren Kanals und dadurch zu einem verstärkten Strom an Kaliumionen von innen nach außen. (B) Die Chimäre Q1TDQ3 mit der Porenregion von KCNQ3 und dem Proteinerückgrat von KCNQ1 kann aufgrund der fehlenden N-Glykosylierungstelle unter Umständen weniger gut öffnen und lässt deshalb weniger Kaliumionen passieren. (C) Der C-Terminus und die Porenregion von KCNQ3 wirken eventuell zusammen regulierend auf die gemessenen Ströme der KCNQ1 Chimäre mit der Porenregion und dem C-Terminus von KCNQ3.

Insgesamt wird daher vermutet, dass die Turret Domäne von KCNQ1 einen verstärkenden Einfluss auf die für KCNQ1 gemessenen Ströme ausübt, und dass durch die Porenregion von KCNQ3 möglicherweise über die von Etxeberria et al., 2004 beschriebene Aminosäure A315 und eventuell in Zusammenhang mit dem C-Terminus von KCNQ3 eine Beeinflussung des für KCNQ3 gemessenen Stroms erfolgt, wie die Abbildung 4.4 verdeutlicht.

## 4.2 Polyklonale Antikörper gegen KCNQ2 und KCNQ3

### 4.2.1 Charakterisierung polyklonaler Antikörper gegen das humane KCNQ2 und KCNQ3

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden insgesamt vier neue polyklonale Antikörper, zwei gegen KCNQ2 und zwei gegen KCNQ3, entwickelt, anschließend aus Kaninchen Serum gereinigt und anhand der in COS-7 Zellen überexprimierten Kanäle von KCNQ2 und KCNQ3 untersucht. Die Charakterisierung der vier Antikörper, zwei gegen KCNQ2, sowie zwei gegen KCNQ3, erbrachte für die durchgeführten Western Blot Analysen der aus COS-7 präparierten

Membranfraktionen von KCNQ2 und KCNQ3 für die untersuchten KCNQ Kanäle sehr spezifische Signale für die überexprimierten Proteine von KCNQ2FLAG und KCNQ3HA. Darüber hinaus wurden von dem untersuchten polyklonalen Antikörper weitere Signale im Western Blot erkannt, bei denen es sich aufgrund ihrer Größe möglicherweise um das Dimer und Trimer von KCNQ2 und KCNQ3 handelt.

In elektrophysiologischen Untersuchungen konnten bereits 1992 von Robbins et al., vier Jahre vor der ersten Beschreibung von KCNQ1, die für die heteromeren Kanäle aus KCNQ2 und KCNQ3, bzw. die für KCNQ3 und KCNQ5 charakteristischen, langsam aktivierbaren  $I_{K(M)}$ -Ströme in NG108-15 Zellen beschrieben werden. Jedoch wurden die für NG108-15 beschriebenen Proteine von KCNQ2, KCNQ3 oder KCNQ5 noch nicht proteinbiochemisch in Western Blot Analysen charakterisiert. Aus diesem Grund wurden Membranpräparate der nicht transfizierten neuronalen Zellkultur von NG108-15 Zellen gleichzeitig mit denen als Kontrolle dienenden Membranpräparaten mit KCNQ2FLAG oder auch KCNQ3HA transfizierter COS-7 Zellen unter Verwendung der polyklonalen Antikörper gegen KCNQ2, sowie gegen KCNQ3 untersucht. Jedoch konnten auch in wiederholten Western Blot Analysen keine Beweise für das Vorhandensein von KCNQ2 oder KCNQ3 auf biochemischen Weg unter Verwendung der für diese Arbeit gegen KCNQ2 und KCNQ3 hergestellten Antikörper für NG108-15 Zellen erbracht werden. Eine mögliche Erklärung für das fehlende Erkennen der für NG108-15 beschriebenen KCNQ Kanäle KCNQ2 und KCNQ3 mit den untersuchten Antikörpern gegen KCNQ2 und gegen KCNQ3 liefert eventuell der unterschiedliche Ursprung der durch eine Fusion von Maus Neuroblastomazellen und Ratten Gliomazellen entstandenen NG108-15 Zellen und der für die humanen Proteine von KCNQ2 und KCNQ3 synthetisierten Antikörper. Neben den NG108-15 Zellen wurden außerdem Gesamtgehirnpräparate, sowie Membranpräparate des Hippocampus unter Verwendung der hier beschriebenen polyklonalen Antikörper gegen KCNQ2 und KCNQ3 untersucht (Daten nicht gezeigt). Auch für diese Präparate konnte kein endogenes Protein von KCNQ2 oder KCNQ3 unter Verwendung der polyklonalen Antikörper gegen KCNQ2 und KCNQ3 nachgewiesen werden, obwohl beide Untereinheiten durch Northern-Blot Analysen bereits für das Kleinhirn, Großhirnrinde, Hinterhauptslappen, Frontallappen, Temporallappen und den Hippocampus identifiziert wurden (Biervert et al., 1998; Yang et al., 1998; Tinel et al., 1998). Cooper et al., gelang es 2000 Antikörper gegen KCNQ2 und KCNQ3 zu entwickeln, die sowohl die in HEK293 Zellen exprimierten Kanäle KCNQ2 und KCNQ3, als auch die beiden endogenen Proteine dieser KCNQ  $\alpha$ -Untereinheiten erkannten. Diese Antikörper waren gegen die Proteinsequenzen 397-423 (Q2C1) und 713-737 (Q2C2) für KCNQ2, sowie gegen die

Proteinsequenz 524-548 (Q3C1) von KCNQ3 gerichtet. Das Epitop des ersten von Cooper et al., 2000 entwickelten Antikörpers Q2C1 stimmte dabei mit dem kleineren Epitop des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Antikörpers 391.1 von Position 402 bis 416 mit der Aminosäureabfolge von KCNQ2 überein. Dennoch konnte vom polyklonalen Antikörper 391.1 kein endogenes KCNQ2 erkannt werden. Eine mögliche Erklärung bietet die Tatsache, dass das für den Antikörper 391.1 gewählte Epitop kleiner als das von Cooper et al., 2000 war. Da polyklonale Antikörper Seren ein Gemisch von mehreren Antikörpern darstellten, die jeweils unterschiedliche Epitope für das Antigen präsentierende Peptid erkennen, könnte es daher sein, dass für den Bereich 397-415 oder aber für den Bereich von 417 bis 423 oder für beide Teilbereiche zusätzliche Antikörper binden, die in dem polyklonalen Antikörperserum 391.1 nicht vorhanden sind.

Die fehlende Antikörpererkennung gegen das endogene Protein von KCNQ2 oder KCNQ3 im Western Blot könnte aber auch dadurch begründet werden, dass aufgrund einer verstärkten Produktion von KCNQ2 und KCNQ3 in transfizierten COS-7 Zellen insgesamt wesentlich mehr Kanäle im Vergleich zu denen in Neuronen des Gehirns gebildet werden.

Es ist aber auch denkbar, dass es eventuell durch eine unnatürliche Überproduktion der beiden KCNQ Kanäle KCNQ2 und KCNQ3 in transfizierten COS-7 Zellen zu einer Anreicherung von Proteinen im Endoplasmatischem Retikulum kommt. Diese Proteine könnten dann weiter aufgrund der fehlenden Modifikation einen verhältnismäßig großen Anteil an dem Gesamtproteingehalt für die präparierten Proteinextrakte haben, weshalb KCNQ2 und KCNQ3 in transfizierten COS-7 Zellen von den polyklonalen Antikörper gegen KCNQ2 und gegen KCNQ3 erkannt werden, hingegen für Proteinpräparate aus dem Gehirn oder aber NG108-15 Zellen nicht.

### **4.3 Pharmakologische Untersuchungen spannungsabhängiger KCNQ Kanäle**

#### **4.3.1 Wirkung von R-L3 auf KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 und KCNQ5**

R-L3 ist der einzig beschriebene Aktivator des  $I_{KS}$ -Stroms des Herzens und seine Strom verstärkende Wirkung auf den zuerst entdeckten spannungsabhängigen Kaliumkanal KCNQ1 wurde bereits 1998 von Salata et al., ein Jahr vor Erstbeschreibung von KCNQ4 (Kubisch et al., 1999) und zwei Jahre vor der Entdeckung von KCNQ5 untersucht (Lerche et al., 2000; Schroeder et al., 2000). Über die Wirkungsweise von R-L3 auf die weiteren KCNQ Kanäle



KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 und KCNQ5 ist derzeit noch nichts berichtet worden. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit der Effekt des Benzodiazepins R-L3 auf die übrigen KCNQ Kanäle KCNQ3, KCNQ4 und KCNQ5 elektrophysiologisch mit Hilfe von mit cRNA injizierten *Xenopus* Oozyten untersucht.

Wie gezeigt werden konnte, erfolgt durch R-L3 eine Beeinflussung des für KCNQ5 in *Xenopus* Oozyten gemessenen Stroms. Für KCNQ2, KCNQ3 und auch für KCNQ4, sowie dem heteromeren Kanal bestehend aus KCNQ2 und KCNQ3 konnte keine Beeinflussung durch R-L3 beobachtet werden.

KCNQ5 weist mit über 40% eine große Übereinstimmung im Vergleich zu den übrigen KCNQ Kanälen auf (Schroeder et al., 2000). Im Bereich der Porenregion, einschließlich der fünften und sechsten Transmembrandomäne, die von Seeböhm et al., 2003 als möglicher Interaktionsbereich von R-L3 mit KCNQ1 identifiziert wurde, unterscheiden sich KCNQ1 und KCNQ5 um insgesamt 34 Aminosäuren. Hingegen unterscheidet sich das für R-L3 sensitive KCNQ5 durch lediglich 9 Aminosäuren vom nicht von R-L3 beeinflussten Kanal von KCNQ4, so dass nur wenige Aminosäuren für eine putative Interaktion von R-L3 mit KCNQ5 in Betracht kommen. Abzüglich der mit KCNQ1 übereinstimmenden Aminosäuren bleiben daher nur die zwei Aminosäuren KCNQ5-E259 und KCNQ5-A266 für eine mögliche Interaktion von KCNQ5 mit R-L3 übrig. Genauere Untersuchungen anhand von durch Punktmutation veränderte Kanäle von KCNQ5 könnten diesbezüglich zu weiteren Aussagen führen.

Durch eine stufenweise Steigerung der Konzentration an R-L3 konnte die Amplitude des Stroms ebenfalls erhöht werden. Jedoch tritt im Gegensatz zu Salata et al., 1998 keine dosisabhängige Inhibierung für KCNQ5 bei einer Konzentration von 10 $\mu$ M an eingesetztem R-L3 auf, wie für KCNQ1 beobachtet. Zusätzliche Kontrollmessungen von KCNQ1 mit 10 $\mu$ M an R-L3 könnten diesbezüglich für Gewissheit sorgen, ob es sich bei dieser nicht beobachteten Inhibierung von KCNQ5 eventuell um eine irrtümliche Beobachtung handelt.

R-L3 hat ebenso keinen Einfluss auf den heteromeren Kanal von KCNQ3 und KCNQ5. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wirkt R-L3 neben KCNQ1 nur auf den homotetrameren Kanal von KCNQ5 und nicht etwa auf heteromere Kanäle von KCNQ5 und KCNQ3, wie es auch für den heteromeren Kanal von KCNQ1 mit KCNE1 beschrieben wurde (Salata et al., 1998). Auch wenn die Wirkung von R-L3 auf den heteromeren Kanal von KCNQ1 und KCNE1 insgesamt schwächer ist, als für den homomeren Kanal von KCNQ1 allein, so ist es erstaunlich, dass für den heteromeren Kanal von KCNQ3 und KCNQ5 kein solcher Effekt mit R-L3 beobachtet wurde.

Ein möglicher zusätzlicher Beweis für die Interaktion von R-L3 mit der Porenregion von KCNQ1 zeigt sich aber dadurch, dass durch die Bindung von KCNE1 im Bereich zwischen den beiden Transmembrandomänen S5 und S6, ein Effekt von R-L3 auf den resultierenden  $I_{KS}$ -Strom des Herzens, im Vergleich zum untersuchten Kanal von KCNQ1 mit R-L3 allein deutlich geringer ist. Möglicherweise führt daher die Assemblierung von KCNQ3 mit KCNQ5 zu einer Abschirmung oder auch Inaktivierung von putativen Bindestellen von R-L3 an KCNQ5, so dass gegebenenfalls die Wirkung von KCNQ5 in Bezug auf R-L3 durch die heteromere Assemblierung von KCNQ3 und KCNQ5 aufgehoben wird.

Mit KCNQ5 konnte daher neben KCNQ1 eine weitere KCNQ Untereinheit identifiziert werden, die durch R-L3 stimuliert wird. Für die übrigen homotetrameren Kanäle KCNQ2, KCNQ3 und KCNQ3, sowie für die heterotetrameren Kanäle von KCNQ2 und KCNQ3, sowie KCNQ3 und KCNQ5 wurde hingegen keine Beeinflussung durch R-L3 beobachtet.

#### **4.4 Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen die herausragende Funktion der beiden carboxy-terminal gelegenen coiled coil Domänen bei der Assemblierung von KCNQ Kanälen.

Für den heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Kanal konnten insgesamt verstärkte Ströme, sowie eine ebenfalls gesteigerte Oberflächenexpression beobachtet werden, die eventuell in Zusammenhang mit einem verstärkten Transport an die Plasmamembran stehen. Durch die heteromere Assemblierung kommt es möglicherweise zur Inaktivierung von putativen ER Retentionssignalen. Zukünftige Arbeiten könnten beispielsweise durch Koimmunpräzipitationsexperimente für Gewissheit sorgen, ob diese verstärkte Oberflächenexpression zusätzlich durch bisher unbekannte und am Transport des heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Kanals an die Plasmamembran beteiligte Proteine begünstigt werden.

Für die Bestimmung der endogenen Stöchiometrie heteromerer KCNQ Kanäle werden für zukünftige Studien neue spezifische Antikörper benötigt, die nicht nur das in COS-7 Zellen überexprimierte, sondern auch die endogen aus Membranpräparaten des Gehirns isolierten Proteine von KCNQ2 und KCNQ3 erkennen.

Für KCNQ3 konnte darüber hinaus ein 65 Aminosäuren großer Bereich identifiziert werden, der wahrscheinlich für die erhöhten Ströme des chimären Kanals mit dem Rückgrat von KCNQ4 und dem C-Terminus von KCNQ3 verantwortlich ist. Es ist möglich, dass die verstärkten Ströme der Chimären mit dem carboxyterminalen Bereich von KCNQ3 oder der Porenregion von KCNQ1 ebenfalls durch verschiedene Transportvorgänge begünstigt werden.

Möglicherweise wird dabei ebenso wie beim heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Kanal eine größere Anzahl von chimären Kanälen an die Plasmamembran gebracht. Die im Rahmen dieser Arbeit angewandten Experimente zur Quantifizierung der Oberflächenexpression von KCNQ2 und KCNQ3 könnten daher auch zur Bestimmung der Oberflächenexpression der untersuchten KCNQ4/KCNQ3 Chimären, sowie für die weiteren Chimären mit der Pore von KCNQ1 dienen. Auch ließe sich ermitteln, ob die für die KCNQ4/KCNQ3 Chimären und die weiteren Chimären mit der KCNQ1 N-Glykosylierungsstelle beobachteten Ströme tatsächlich auf einem gesteigerten Transport beruhen, oder ob eventuell andere Einflüsse, wie ein verändertes „gating“ der Kanäle für die gemessenen Effekte verantwortlich sind.

R-L3 ist ein Aktivator für den homotetrameren Kanal von KCNQ1. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, scheint KCNQ5 ebenfalls von R-L3 stimuliert zu werden. Jedoch zeigt der heterotetramere Kanal KCNQ3/KCNQ5 nicht von R-L3 beeinflusst zu werden. Für KCNQ1 konnte gezeigt werden, dass der Bereich zwischen S5 und S6 für die Interaktion mit R-L3 in Betracht kommt (Seebohm et al., 2003). Für KCNQ5 könnte daher die Interaktion von R-L3 über denselben Bereich erfolgen. Da beispielsweise KCNQ4 nicht sensitiv auf R-L3 reagiert, könnte in weiteren Arbeiten durch einen homologen Austausch zwischen KCNQ5 und KCNQ4 eine Eingrenzung des für die Interaktion von KCNQ5 mit R-L3 wichtigen Bereiches erfolgen und so eventuell aufgeklärt werden, warum der heteromere KCNQ3/KCNQ5 Kanal nicht durch R-L3 aktiviert wird.

## 5. Zusammenfassung

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass für eine erfolgreiche Interaktion der KCNQ Untereinheiten der carboxyterminale Bereich der Kanäle verantwortlich ist. Sowohl die homomere, als auch die heteromere Assemblierung der KCNQ Kanäle wird dabei durch die beiden coiled coil Domänen im Bereich der si-Domäne vermittelt, wobei die zweite coiled coil Domäne einen verstärkten Einfluss auf die Heteromerisierung der KCNQ Kanäle ausübt.

Untersuchungen zur Assemblierung des heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Kanals ergaben eine verstärkte Oberflächenexpression, die eventuell in Zusammenhang mit einem gesteigerten Transport an die Zelloberfläche steht und daher möglicherweise durch die zweite coiled coil Domäne der KCNQ Kanäle vermittelt wird.

In der Nähe der zweiten coiled coil Domäne von KCNQ5 befindet sich eine putative PKA abhängige Phosphorylierungsstelle, von der daher vermutet wurde, dass diese einen Einfluss auf die Assemblierung von KCNQ5 oder auf den heteromeren Kanal KCNQ3/KCNQ5 ausüben könnte. Jedoch konnte durch *in vitro* Experimente zur putativen PKA abhängigen Phosphorylierung von KCNQ5 keine selbige beobachtet werden. Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben dagegen für den durch Punktmutation veränderten Kanal von KCNQ5 mit einem Glutamatrest an Stelle der putativen PKA Phosphorylierung einen verstärkten Strom, so dass möglicherweise andere Phosphorylierungen oder bisher unbekannt Modifikationen von KCNQ5 für den beobachteten Effekt verantwortlich sind.

Darüber hinaus konnte für KCNQ3 ein zusätzlicher 65 Aminosäuren großer carboxyterminaler Bereich identifiziert werden, der ebenfalls für einen verstärkten Strom des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten chimären Kanals mit dem Proteinerückgrat von KCNQ4 und dem C-Terminus von KCNQ3 verantwortlich ist. Die Ursache für diese verstärkten Ströme ist noch ungeklärt, basiert aber möglicherweise auf einer ebenfalls erhöhten Oberflächenexpression des chimären KCNQ3/KCNQ4 Kanals.

Für zusätzliche *in vivo* Untersuchungen zur endogenen Stöchiometrie heteromerer KCNQ2/KCNQ3 Kanäle wurden spezifische Antikörper benötigt, die endogenes KCNQ2 und KCNQ3 erkennen. Die neu synthetisierten polyklonalen Antikörper gegen KCNQ2 und gegen KCNQ3 erkannten nur das in COS-7 Zellen überexprimierte Protein von KCNQ2 und KCNQ3. Für Membranpräparate aus dem Gehirn von Mäusen, sowie für die neuronale Zellkultur NG-10815 konnte dabei jedoch kein endogenes KCNQ2 oder KCNQ3 nachgewiesen werden.

Untersuchungen an KCNQ1/KCNQ3 Chimären ergaben im Gegensatz zu den verstärkten Strömen der KCNQ3/KCNQ4 Chimären, dass die Porenregion von KCNQ3 vermutlich regulierend auf die in *Xenopus* Oozyten beobachteten Ströme wirkt.

Hingegen bewirkt die Porenregion von KCNQ1 einen verstärkten Strom für injizierte *Xenopus* Oozyten. Chimären von KCNQ2, KCNQ4 und KCNQ5, bei denen die Pore gegen die Porenregion von KCNQ1 mit der bereits bekannten N-Glykosylierungsstelle ausgetauscht wurde, zeigten ebenfalls in elektrophysiologischen Experimenten deutlich verstärkte Ströme im Vergleich zu den unveränderten Kanälen von KCNQ2, KCNQ4 und KCNQ5. Obwohl eine N-Glykosylierung von KCNQ1 im Western Blot für transfizierte COS-7 Zellen nicht beobachtet wurde, könnte daher dennoch eine N-Glykosylierung von KCNQ1 für den stromverstärkenden Effekt der Porenregion von KCNQ1 verantwortlich sein.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Benzodiazepin R-L3 nicht nur stimulierend auf KCNQ1, sondern ebenfalls auf KCNQ5 wirkt. Jedoch scheint der heteromere Kanal von KCNQ5 und KCNQ3 nicht von R-L3 beeinflusst zu werden. Elektrophysiologische Untersuchungen für KCNQ2, KCNQ3 und KCNQ4, sowie des heteromeren Kanals von KCNQ2 und KCNQ3 ergaben keine signifikante Veränderung nach Behandlung mit R-L3.

Zusammenfassend konnte in elektrophysiologischen und in pharmakologischen Untersuchungen zu spannungsabhängigen KCNQ Kanälen gezeigt werden, dass der carboxyterminale Bereich entscheidend für die erfolgreiche Assemblierung von KCNQ Kanälen ist und dass neben KCNQ1 die weitere Untereinheit KCNQ5 mit Hilfe von R-L3 stimuliert werden kann.

## 6. Summary

Resuming the results, there is a strong evidence for a C-terminal interaction of voltage gated KCNQ potassium channels. The subunit assembly seems to depend on two specific C-terminal coiled coil domains which are a part of the KCNQ si-domain.

The first KCNQ coiled coil domain possibly takes part in the homotetramerization process whereas the second coiled coil domain has a strong effect on the heteromerization of KCNQ2 and KCNQ3.

Mutations of a putative PKA dependent phosphorylation site close to the second coiled coil domain of KCNQ5 leads to higher currents in *Xenopus* oocytes in electrophysiological experiments. PKA dependent phosphorylation is probably not the reason for this finding.

A C-terminal 65 amino acid stretch was identified in KCNQ3, which is most likely responsible for the observed amplified currents of a chimeric KCNQ channel consisting of the backbone from KCNQ4 with the C-terminus of KCNQ3.

In contrast, the pore loop of KCNQ3 possibly serves as an internal controller. The exchange of the current amplifying C-terminus from KCNQ3 with the C-terminus of KCNQ1 could not rescue the inhibiting effect of the KCNQ3 pore loop.

On the other hand the exchange of the pore region from KCNQ2, KCNQ4 and KCNQ5 with the pore region of KCNQ1 led to increased currents in cRNA injected *Xenopus* oocytes, in comparison to KCNQ2, KCNQ4 and KCNQ5 wild type channels. Although no N-glycosylation of KCNQ1 could be observed in Western blot experiments in overexpressing COS-7 cells, a potential KCNQ1 N-glycosylation event is most likely responsible for these higher currents.

Newly synthesized antibodies against KCNQ2 and also against KCNQ3 detected KCNQ2 and KCNQ3 when overexpressed in COS-7 cells. In membrane fractions from mouse brain and NG108-15 cells no endogenous signal could be observed.

Pharmacological experiments show that there is a stimulating effect of the Benzodiazepin R-L3 on the recently discovered KCNQ subunit KCNQ5. In contrast no effect could be detected for the heteromeric channel consisting of KCNQ3 and KCNQ5 in *Xenopus* oocytes. For wild type KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 and for the heteromeric KCNQ2/KCNQ3 channel no stimulation with R-L3 was observed.

## 7. Literatur

**Ahern, C. A.** and R. Horn (2004). "Stirring up controversy with a voltage sensor paddle." *Trends Neurosci* 27(6): 303-7.

**Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., and M. Raff, Roberts, K., and Walter, P.** (2003). "Molekularbiologie der Zelle, 4. Auflage (deutsch)." Wiley-VCH.

**Albrecht, R., P. Rehling, A. Chacinska, J. Brix, S. A. Cadamuro, R. Volkmer, B. Guiard, N. Pfanner and K. Zeth** (2006). "The Tim21 binding domain connects the preprotein translocases of both mitochondrial membranes." *EMBO Rep* 7(12): 1233-8.

**Angelo, K., T. Jespersen, M. Grunnet, M. S. Nielsen, D. A. Klaerke and S. P. Olesen** (2002). "KCNE5 induces time- and voltage-dependent modulation of the KCNQ1 current." *Biophys J* 83(4): 1997-2006.

**Apell, H. J.** (2003). "Toward an understanding of ion transport through the Na,K-ATPase." *Ann N Y Acad Sci* 986: 133-40.

**Armand, V., C. Rundfeldt and U. Heinemann** (1999). "Effects of retigabine (D-23129) on different patterns of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat entorhinal cortex hippocampal slices." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359(1): 33-9.

**Ashcroft, F. M.** (2000). "Ion Channels and Disease: Channelopathies." Academic Press; 1st edition.

**Bardwell, V. J.** and R. Treisman (1994). "The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif." *Genes Dev* 8(14): 1664-77.

**Barhanin, J., F. Lesage, E. Guillemare, M. Fink, M. Lazdunski and G. Romey** (1996). "K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current." *Nature* 384(6604): 78-80.

**Bassi, M. T., U. Balottin, C. Panzeri, P. Piccinelli, P. Castaldo, V. Barrese, M. V. Soldovieri, F. Miceli, M. Colombo, N. Bresolin, R. Borgatti and M. Tagliatela** (2005). "Functional analysis of novel KCNQ2 and KCNQ3 gene variants found in a large pedigree with benign familial neonatal convulsions (BFNC)." *Neurogenetics* 6(4): 185-93.

**Bezánilla, F.** (2005). "Voltage-gated ion channels." *IEEE Trans Nanobioscience* 4(1): 34-48.

**Biervert, C., B. C. Schroeder, C. Kubisch, S. F. Berkovic, P. Propping, T. J. Jentsch and O. K. Steinlein** (1998). "A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy." *Science* 279(5349): 403-6.

**Blaustein, R. O.** and C. Miller (2004). "Ion channels: shake, rattle or roll?" *Nature* 427(6974): 499-500.

**Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.

**Brown**, D. A. and E. London (1998). "Functions of lipid rafts in biological membranes." *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 111-36.

**Bullock**, W. O., Fernandez, J.M., Stuart, J.M. (1987). "XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection." *Biotechniques*(5): 376-379.

**Charlier**, C., N. A. Singh, S. G. Ryan, T. B. Lewis, B. E. Reus, R. J. Leach and M. Leppert (1998). "A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family." *Nat Genet* 18(1): 53-5.

**Chen**, Y. H., S. J. Xu, S. Bendahhou, X. L. Wang, Y. Wang, W. Y. Xu, H. W. Jin, H. Sun, X. Y. Su, Q. N. Zhuang, Y. Q. Yang, Y. B. Li, Y. Liu, H. J. Xu, X. F. Li, N. Ma, C. P. Mou, Z. Chen, J. Barhanin and W. Huang (2003). "KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation." *Science* 299(5604): 251-4.

**Cheng**, J. H. and I. Kodama (2004). "Two components of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in heart: molecular basis, functional diversity, and contribution to repolarization." *Acta Pharmacol Sin* 25(2): 137-45.

**Chouabe**, C., N. Neyroud, P. Richard, I. Denjoy, B. Hainque, G. Romey, M. D. Drici, P. Guicheney and J. Barhanin (2000). "Novel mutations in KvLQT1 that affect I<sub>ks</sub> activation through interactions with Isk." *Cardiovasc Res* 45(4): 971-80.

**Cooper**, E. C., K. D. Aldape, A. Abosch, N. M. Barbaro, M. S. Berger, W. S. Peacock, Y. N. Jan and L. Y. Jan (2000). "Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9): 4914-9.

**Cuervo**, A. M. and J. F. Dice (2000). "Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane." *Traffic* 1(7): 570-83.

**Dahl**, S. G., I. Sylte and A. W. Ravna (2004). "Structures and models of transporter proteins." *J Pharmacol Exp Ther* 309(3): 853-60.

**Delmas**, P. and D. A. Brown (2005). "Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels." *Nat Rev Neurosci* 6(11): 850-62.

**Dilly**, K. W., J. Kurokawa, C. Terrenoire, S. Reiken, W. J. Lederer, A. R. Marks and R. S. Kass (2004). "Overexpression of beta2-adrenergic receptors cAMP-dependent protein kinase phosphorylates and modulates slow delayed rectifier potassium channels expressed in murine heart: evidence for receptor/channel co-localization." *J Biol Chem* 279(39): 40778-87.

**Donger**, C., I. Denjoy, M. Berthet, N. Neyroud, C. Cruaud, M. Bennaceur, G. Chivoret, K. Schwartz, P. Coumel and P. Guicheney (1997). "KVLQT1 C-terminal missense mutation causes a forme fruste long-QT syndrome." *Circulation* 96(9): 2778-81.

**Doupnik**, C. A., N. Davidson and H. A. Lester (1995). "The inward rectifier potassium channel family." *Curr Opin Neurobiol* 5(3): 268-77.



- Doyle, D. A., J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait and R. MacKinnon (1998).** "The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity." *Science* 280(5360): 69-77.
- Durell, S. R. and H. R. Guy (1992).** "Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels." *Biophys J* 62(1): 238-47; discussion 247-50.
- Durell, S. R., Y. Hao and H. R. Guy (1998).** "Structural models of the transmembrane region of voltage-gated and other K<sup>+</sup> channels in open, closed, and inactivated conformations." *J Struct Biol* 121(2): 263-84.
- Durell, S. R., I. H. Shrivastava and H. R. Guy (2004).** "Models of the structure and voltage-gating mechanism of the shaker K<sup>+</sup> channel." *Biophys J* 87(4): 2116-30.
- Etxeberria, A., I. Santana-Castro, M. P. Regalado, P. Aivar and A. Villarroel (2004).** "Three mechanisms underlie KCNQ2/3 heteromeric potassium M-channel potentiation." *J Neurosci* 24(41): 9146-52.
- Finley, M. R., Y. Li, F. Hua, J. Lillich, K. E. Mitchell, S. Ganta, R. F. Gilmour, Jr. and L. C. Freeman (2002).** "Expression and coassociation of ERG1, KCNQ1, and KCNE1 potassium channel proteins in horse heart." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(1): H126-38.
- Flores, S. Y., C. Debonneville and O. Staub (2003).** "The role of Nedd4/Nedd4-like dependant ubiquitylation in epithelial transport processes." *Pflugers Arch* 446(3): 334-8.
- Freeman, L. C., J. J. Lippold and K. E. Mitchell (2000).** "Glycosylation influences gating and pH sensitivity of I(sK)." *J Membr Biol* 177(1): 65-79.
- Gambale, F. and N. Uozumi (2006).** "Properties of shaker-type potassium channels in higher plants." *J Membr Biol* 210(1): 1-19.
- Gamper, N., Y. Li and M. S. Shapiro (2005).** "Structural requirements for differential sensitivity of KCNQ K<sup>+</sup> channels to modulation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin." *Mol Biol Cell* 16(8): 3538-51.
- Gandhi, C. S. and E. Y. Isacoff (2002).** "Molecular models of voltage sensing." *J Gen Physiol* 120(4): 455-63.
- Gluzman, Y. (1981).** "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." *Cell* 23(1): 175-82.
- Goldstein, S. A., D. Bockenhauer, I. O'Kelly and N. Zilberberg (2001).** "Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits." *Nat Rev Neurosci* 2(3): 175-84.
- Goldstein, S. A., D. A. Bayliss, D. Kim, F. Lesage, L. D. Plant and S. Rajan (2005).** "International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels." *Pharmacol Rev* 57(4): 527-40.
- Gouaux, E. and R. Mackinnon (2005).** "Principles of selective ion transport in channels and pumps." *Science* 310(5753): 1461-5.

- Graham**, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* 36(1): 59-74.
- Gu**, C., Y. N. Jan and L. Y. Jan (2003). "A conserved domain in axonal targeting of Kv1 (Shaker) voltage-gated potassium channels." *Science* 301(5633): 646-9.
- Gulbis**, J. M., M. Zhou, S. Mann and R. MacKinnon (2000). "Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels." *Science* 289(5476): 123-7.
- Gutman**, G. A., K. G. Chandy, S. Grissmer, M. Lazdunski, D. McKinnon, L. A. Pardo, G. A. Robertson, B. Rudy, M. C. Sanguinetti, W. Stuhmer and X. Wang (2005). "International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels." *Pharmacol Rev* 57(4): 473-508.
- Hadley**, J. K., M. Noda, A. A. Selyanko, I. C. Wood, F. C. Abogadie and D. A. Brown (2000). "Differential tetraethylammonium sensitivity of KCNQ1-4 potassium channels." *Br J Pharmacol* 129(3): 413-5.
- Hadley**, J. K., G. M. Passmore, L. Tatulian, M. Al-Qatari, F. Ye, A. D. Wickenden and D. A. Brown (2003). "Stoichiometry of expressed KCNQ2/KCNQ3 potassium channels and subunit composition of native ganglionic M channels deduced from block by tetraethylammonium." *J Neurosci* 23(12): 5012-9.
- Hamprecht**, B. (1977). "Structural, electrophysiological, biochemical, and pharmacological properties of neuroblastoma-glioma cell hybrids in cell culture." *Int Rev Cytol* 49: 99-170.
- Harbury**, P. B., T. Zhang, P. S. Kim and T. Alber (1993). "A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants." *Science* 262(5138): 1401-7.
- Harbury**, P. B., P. S. Kim and T. Alber (1994). "Crystal structure of an isoleucine-zipper trimer." *Nature* 371(6492): 80-3.
- Heginbotham**, L., T. Abramson and R. MacKinnon (1992a). "A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K<sup>+</sup> channels." *Science* 258(5085): 1152-5.
- Heginbotham**, L. and R. MacKinnon (1992b). "The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels." *Neuron* 8(3): 483-91.
- Heginbotham**, L. and R. MacKinnon (1993). "Conduction properties of the cloned Shaker K<sup>+</sup> channel." *Biophys J* 65(5): 2089-96.
- Heitzmann**, D., V. Koren, M. Wagner, C. Sterner, M. Reichold, I. Tegtmeier, T. Volk and R. Warth (2007). "KCNE beta subunits determine pH sensitivity of KCNQ1 potassium channels." *Cell Physiol Biochem* 19(1-4): 21-32.
- Held**, D., Yaeger, K., and Novy R. (2003). "pCOLADuet<sup>TM</sup>-1, a lower-copy, KanR vector option for coexpression in E. coli." *inNovations*, (18): 4.
- Higuchi**, R. (1990). "Recombinant PCR. In: PCR Protocols: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Editors." Academic Press Inc., San Diego: pp.177-188.

**Hille, B., C. M. Armstrong and R. MacKinnon (1999).** "Ion channels: from idea to reality." *Nat Med* 5(10): 1105-9.

**Hille, B. (2001).** "Ion Channels of Excitable Membranes." Sinauer Associates Inc., U.S., 3rd edition.

**Hirose, S., F. Zenri, H. Akiyoshi, G. Fukuma, H. Iwata, T. Inoue, M. Yonetani, M. Tsutsumi, H. Muranaka, T. Kurokawa, T. Hanai, K. Wada, S. Kaneko and A. Mitsudome (2000).** "A novel mutation of KCNQ3 (c.925T-->C) in a Japanese family with benign familial neonatal convulsions." *Ann Neurol* 47(6): 822-6.

**Hoshi, N., J. S. Zhang, M. Omaki, T. Takeuchi, S. Yokoyama, N. Wanaverbecq, L. K. Langeberg, Y. Yoneda, J. D. Scott, D. A. Brown and H. Higashida (2003).** "AKAP150 signaling complex promotes suppression of the M-current by muscarinic agonists." *Nat Neurosci* 6(6): 564-71.

**Howard, R. J., K. A. Clark, J. M. Holton and D. L. Minor, Jr. (2007).** "Structural insight into KCNQ (Kv7) channel assembly and channelopathy." *Neuron* 53(5): 663-75.

**Itoh, T., T. Tanaka, R. Nagai, K. Kikuchi, S. Ogawa, S. Okada, S. Yamagata, K. Yano, Y. Yazaki and Y. Nakamura (1998).** "Genomic organization and mutational analysis of KVLQT1, a gene responsible for familial long QT syndrome." *Hum Genet* 103(3): 290-4.

**Jenke, M., A. Sanchez, F. Monje, W. Stuhmer, R. M. Weseloh and L. A. Pardo (2003).** "C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels." *Embo J* 22(3): 395-403.

**Jentsch, T. J. (2000).** "Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease." *Nat Rev Neurosci* 1(1): 21-30.

**Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B. T. Chait and R. MacKinnon (2003).** "X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel." *Nature* 423(6935): 33-41.

**Kamb, A., L. E. Iverson and M. A. Tanouye (1987).** "Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel." *Cell* 50(3): 405-13.

**Kannankeril, P. J. and D. M. Roden (2007).** "Drug-induced long QT and torsade de pointes: recent advances." *Curr Opin Cardiol* 22(1): 39-43.

**Keating, M. T. and M. C. Sanguinetti (2001).** "Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias." *Cell* 104(4): 569-80.

**Kobertz, W. R. and C. Miller (1999).** "K<sup>+</sup> channels lacking the 'tetramerization' domain: implications for pore structure." *Nat Struct Biol* 6(12): 1122-5.

**Kobertz, W. R., C. Williams and C. Miller (2000).** "Hanging gondola structure of the T1 domain in a voltage-gated K(+) channel." *Biochemistry* 39(34): 10347-52.

**Kornfeld, R. and S. Kornfeld (1985).** "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." *Annu Rev Biochem* 54: 631-64.

- Kreusch**, A., P. J. Pfaffinger, C. F. Stevens and S. Choe (1998). "Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel." *Nature* 392(6679): 945-8.
- Krieg**, P. A. and D. A. Melton (1984). "Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs." *Nucleic Acids Res* 12(18): 7057-70.
- Kubisch**, C., B. C. Schroeder, T. Friedrich, B. Lutjohann, A. El-Amraoui, S. Marlin, C. Petit and T. J. Jentsch (1999). "KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness." *Cell* 96(3): 437-46.
- Kubo**, Y., J. P. Adelman, D. E. Clapham, L. Y. Jan, A. Karschin, Y. Kurachi, M. Lazdunski, C. G. Nichols, S. Seino and C. A. Vandenberg (2005). "International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels." *Pharmacol Rev* 57(4): 509-26.
- Kuchler**, K. and J. Thorner (1992). "Secretion of peptides and proteins lacking hydrophobic signal sequences: the role of adenosine triphosphate-driven membrane translocators." *Endocr Rev* 13(3): 499-514.
- Laemmli**, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- Langner**, M. and K. Kubica (1999). "The electrostatics of lipid surfaces." *Chem Phys Lipids* 101(1): 3-35.
- Lee**, A. G. (2001). "Myelin: Delivery by raft." *Curr Biol* 11(2): R60-2.
- Lee**, T. E., L. H. Philipson, A. Kuznetsov and D. J. Nelson (1994). "Structural determinant for assembly of mammalian K<sup>+</sup> channels." *Biophys J* 66(3 Pt 1): 667-73.
- LeMasurier**, M., L. Heginbotham and C. Miller (2001). "KcsA: it's a potassium channel." *J Gen Physiol* 118(3): 303-14.
- Lerche**, H., C. Biervert, A. K. Alekov, L. Schleithoff, M. Lindner, W. Klinger, F. Bretschneider, N. Mitrovic, K. Jurkat-Rott, H. Bode, F. Lehmann-Horn and O. K. Steinlein (1999). "A reduced K<sup>+</sup> current due to a novel mutation in KCNQ2 causes neonatal convulsions." *Ann Neurol* 46(3): 305-12.
- Lerche**, C., C. R. Scherer, G. Seebohm, C. Derst, A. D. Wei, A. E. Busch and K. Steinmeyer (2000). "Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity." *J Biol Chem* 275(29): 22395-400.
- Li**, M., Y. N. Jan and L. Y. Jan (1992). "Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel." *Science* 257(5074): 1225-30.
- Li**, Y., N. Gamper and M. S. Shapiro (2004). "Single-channel analysis of KCNQ K<sup>+</sup> channels reveals the mechanism of augmentation by a cysteine-modifying reagent." *J Neurosci* 24(22): 5079-90.

- Lorenz, C., M. Pusch and T. J. Jentsch (1996).** "Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23): 13362-6.
- Lovejoy, B., S. Choe, D. Cascio, D. K. McRorie, W. F. DeGrado and D. Eisenberg (1993).** "Crystal structure of a synthetic triple-stranded alpha-helical bundle." *Science* 259(5099): 1288-93.
- Ludwig, J., D. Owen and O. Pongs (1997).** "Carboxy-terminal domain mediates assembly of the voltage-gated rat ether-a-go-go potassium channel." *Embo J* 16(21): 6337-45.
- Lumb, K. J. and P. S. Kim (1995).** "A buried polar interaction imparts structural uniqueness in a designed heterodimeric coiled coil." *Biochemistry* 34(27): 8642-8.
- Lupas, A., M. Van Dyke and J. Stock (1991).** "Predicting coiled coils from protein sequences." *Science* 252(5010): 1162-4.
- Lupas, A. (1996).** "Coiled coils: new structures and new functions." *Trends Biochem Sci* 21(10): 375-82.
- MacKinnon, R. and G. Yellen (1990).** "Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K<sup>+</sup> channels." *Science* 250(4978): 276-9.
- MacKinnon, R. (2003).** "Potassium channels." *FEBS Lett* 555(1): 62-5.
- MacKinnon, R. (2004).** "Nobel Lecture. Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction." *Biosci Rep* 24(2): 75-100.
- Maljevic, S., C. Lerche, G. Seebohm, A. K. Alekov, A. E. Busch and H. Lerche (2003).** "C-terminal interaction of KCNQ2 and KCNQ3 K<sup>+</sup> channels." *J Physiol* 548(Pt 2): 353-60.
- Maretzky, T., K. Reiss, A. Ludwig, J. Buchholz, F. Scholz, E. Proksch, B. de Strooper, D. Hartmann and P. Saftig (2005).** "ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(26): 9182-7.
- Martin, J., M. Gruber and A. N. Lupas (2004).** "Coiled coils meet the chaperone world." *Trends Biochem Sci* 29(9): 455-8.
- Marx, S. O., J. Kurokawa, S. Reiken, H. Motoike, J. D'Armiento, A. R. Marks and R. S. Kass (2002).** "Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel." *Science* 295(5554): 496-9.
- Meves, H., J. R. Schwarz and I. Wulfsen (1999).** "Separation of M-like current and ERG current in NG108-15 cells." *Br J Pharmacol* 127(5): 1213-23.
- Milkman, R. (1994).** "An *Escherichia coli* homologue of eukaryotic potassium channel proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9): 3510-4.
- Minor, D. L., Y. F. Lin, B. C. Mobley, A. Avelar, Y. N. Jan, L. Y. Jan and J. M. Berger (2000).** "The polar T1 interface is linked to conformational changes that open the voltage-gated potassium channel." *Cell* 102(5): 657-70.

**Miraglia del Giudice, E., G. Coppola, G. Scuccimarra, G. Cirillo, G. Bellini and A. Pascotto (2000).** "Benign familial neonatal convulsions (BFNC) resulting from mutation of the KCNQ2 voltage sensor." *Eur J Hum Genet* 8(12): 994-7.

**Nagaya, N. and D. M. Papazian (1997).** "Potassium channel alpha and beta subunits assemble in the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 272(5): 3022-7.

**Neyroud, N., F. Tesson, I. Denjoy, M. Leibovici, C. Donger, J. Barhanin, S. Faure, F. Gary, P. Coumel, C. Petit, K. Schwartz and P. Guicheney (1997).** "A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome." *Nat Genet* 15(2): 186-9.

**Neyroud, N., P. Richard, N. Vignier, C. Donger, I. Denjoy, L. Demay, M. Shkolnikova, R. Pesce, P. Chevalier, B. Hainque, P. Coumel, K. Schwartz and P. Guicheney (1999).** "Genomic organization of the KCNQ1 K<sup>+</sup> channel gene and identification of C-terminal mutations in the long-QT syndrome." *Circ Res* 84(3): 290-7.

**Nichols, C. G. and A. N. Lopatin (1997).** "Inward rectifier potassium channels." *Annu Rev Physiol* 59: 171-91.

**O'Connell, A. D., Q. Leng, K. Dong, G. G. MacGregor, G. Giebisch and S. C. Hebert (2005).** "Phosphorylation-regulated endoplasmic reticulum retention signal in the renal outer-medullary K<sup>+</sup> channel (ROMK)." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(28): 9954-9.

**Pearce, D. (2003).** "SGK1 regulation of epithelial sodium transport." *Cell Physiol Biochem* 13(1): 13-20.

**Pfaffinger, P. J. and D. DeRubeis (1995).** "Shaker K<sup>+</sup> channel T1 domain self-tetramerizes to a stable structure." *J Biol Chem* 270(48): 28595-600.

**Piippo, K., H. Swan, M. Pasternack, H. Chapman, K. Paavonen, M. Viitasalo, L. Toivonen and K. Kontula (2001).** "A founder mutation of the potassium channel KCNQ1 in long QT syndrome: implications for estimation of disease prevalence and molecular diagnostics." *J Am Coll Cardiol* 37(2): 562-8.

**Prole, D. L. and N. V. Marrion (2004).** "Ionic permeation and conduction properties of neuronal KCNQ2/KCNQ3 potassium channels." *Biophys J* 86(3): 1454-69.

**Raab-Graham, K. F. and C. A. Vandenberg (1998).** "Tetrameric subunit structure of the native brain inwardly rectifying potassium channel Kir 2.2." *J Biol Chem* 273(31): 19699-707.

**Reimann, F. and F. M. Ashcroft (1999).** "Inwardly rectifying potassium channels." *Curr Opin Cell Biol* 11(4): 503-8.

**Robbins, J., J. Trouslard, S. J. Marsh and D. A. Brown (1992).** "Kinetic and pharmacological properties of the M-current in rodent neuroblastoma x glioma hybrid cells." *J Physiol* 451: 159-85.

**Robbins, J. (2001).** "KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Ther* 90(1): 1-19.

**Rosenberg**, A. H., B. N. Lade, D. S. Chui, S. W. Lin, J. J. Dunn and F. W. Studier (1987). "Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase." *Gene* 56(1): 125-35.

**Saier**, M. H., Jr. (2000). "A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters." *Microbiol Mol Biol Rev* 64(2): 354-411.

**Saiki**, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* 230(4732): 1350-4.

**Saiki**, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239(4839): 487-91.

**Salata**, J. J., N. K. Jurkiewicz, J. Wang, B. E. Evans, H. T. Orme and M. C. Sanguinetti (1998). "A novel benzodiazepine that activates cardiac slow delayed rectifier K<sup>+</sup> currents." *Mol Pharmacol* 54(1): 220-30.

**Sanguinetti**, M. C., M. E. Curran, A. Zou, J. Shen, P. S. Spector, D. L. Atkinson and M. T. Keating (1996). "Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel." *Nature* 384(6604): 80-3.

**Schenzer**, A., T. Friedrich, M. Pusch, P. Saftig, T. J. Jentsch, J. Grotzinger and M. Schwake (2005). "Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K<sup>+</sup> channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine." *J Neurosci* 25(20): 5051-60.

**Schmitt**, N., M. Schwarz, A. Peretz, I. Abitbol, B. Attali and O. Pongs (2000). "A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly." *Embo J* 19(3): 332-40.

**Schroeder**, B. C., C. Kubisch, V. Stein and T. J. Jentsch (1998). "Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K<sup>+</sup> channels causes epilepsy." *Nature* 396(6712): 687-90.

**Schroeder**, B. C., M. Hechenberger, F. Weinreich, C. Kubisch and T. J. Jentsch (2000a). "KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents." *J Biol Chem* 275(31): 24089-95.

**Schroeder**, B. C., S. Waldegger, S. Fehr, M. Bleich, R. Warth, R. Greger and T. J. Jentsch (2000b). "A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3." *Nature* 403(6766): 196-9.

**Schwake**, M., M. Pusch, T. Kharkovets and T. J. Jentsch (2000). "Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K<sup>+</sup> channels involved in epilepsy." *J Biol Chem* 275(18): 13343-8.

**Schwake**, M., T. J. Jentsch and T. Friedrich (2003). "A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K<sup>+</sup> channel assembly." *EMBO Rep* 4(1): 76-81.

**Schwake**, M., D. Athanasiadu, C. Beimgraben, J. Blanz, C. Beck, T. J. Jentsch, P. Saftig and T. Friedrich (2006). "Structural determinants of M-type KCNQ (Kv7) K<sup>+</sup> channel assembly." *J Neurosci* 26(14): 3757-66.

**Seebohm**, G., C. R. Scherer, A. E. Busch and C. Lerche (2001). "Identification of specific pore residues mediating KCNQ1 inactivation. A novel mechanism for long QT syndrome." *J Biol Chem* 276(17): 13600-5.

**Seebohm**, G., J. Chen, N. Strutz, C. Culberson, C. Lerche and M. C. Sanguinetti (2003). "Molecular determinants of KCNQ1 channel block by a benzodiazepine." *Mol Pharmacol* 64(1): 70-7.

**Seebohm**, G., N. Strutz-Seebohm, R. Baltaev, G. Korniychuk, M. Knirsch, J. Engel and F. Lang (2005a). "Regulation of KCNQ4 potassium channel prepulse dependence and current amplitude by SGK1 in *Xenopus* oocytes." *Cell Physiol Biochem* 16(4-6): 255-62.

**Seebohm**, G., P. Westenskow, F. Lang and M. C. Sanguinetti (2005b). "Mutation of colocalized residues of the pore helix and transmembrane segments S5 and S6 disrupt deactivation and modify inactivation of KCNQ1 K<sup>+</sup> channels." *J Physiol* 563(Pt 2): 359-68.

**Selyanko**, A. A., J. K. Hadley, I. C. Wood, F. C. Abogadie, P. Delmas, N. J. Buckley, B. London and D. A. Brown (1999). "Two types of K<sup>(+)</sup> channel subunit, Erg1 and KCNQ2/3, contribute to the M-like current in a mammalian neuronal cell." *J Neurosci* 19(18): 7742-56.

**Shieh**, C. C., M. Coghlan, J. P. Sullivan and M. Gopalakrishnan (2000). "Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities." *Pharmacol Rev* 52(4): 557-94.

**Sigworth**, F. J. (2003). "Structural biology: Life's transistors." *Nature* 423(6935): 21-2.

**Singer**, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." *Science* 175(23): 720-31.

**Singh**, N. A., C. Charlier, D. Stauffer, B. R. DuPont, R. J. Leach, R. Melis, G. M. Ronen, I. Bjerre, T. Quattlebaum, J. V. Murphy, M. L. McHarg, D. Gagnon, T. O. Rosales, A. Peiffer, V. E. Anderson and M. Leppert (1998). "A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns." *Nat Genet* 18(1): 25-9.

**Singh**, N. A., P. Westenskow, C. Charlier, C. Pappas, J. Leslie, J. Dillon, V. E. Anderson, M. C. Sanguinetti and M. F. Leppert (2003). "KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum." *Brain* 126(Pt 12): 2726-37.

**Soding**, J. and A. N. Lupas (2003). "More than the sum of their parts: on the evolution of proteins from peptides." *Bioessays* 25(9): 837-46.

**Splawski**, I., J. Shen, K. W. Timothy, M. H. Lehmann, S. Priori, J. L. Robinson, A. J. Moss, P. J. Schwartz, J. A. Towbin, G. M. Vincent and M. T. Keating (2000). "Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2." *Circulation* 102(10): 1178-85.



**Starace**, D. M. and F. Bezanilla (2004). "A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field." *Nature* 427(6974): 548-53.

**Stogios**, P. J., G. S. Downs, J. J. Jauhal, S. K. Nandra and G. G. Prive (2005). "Sequence and structural analysis of BTB domain proteins." *Genome Biol* 6(10): R82.

**Strang**, C., S. J. Cushman, D. DeRubeis, D. Peterson and P. J. Pfaffinger (2001). "A central role for the T1 domain in voltage-gated potassium channel formation and function." *J Biol Chem* 276(30): 28493-502.

**Strutz-Seebohm**, N., G. Seebohm, O. Fedorenko, R. Baltaev, J. Engel, M. Knirsch and F. Lang (2006). "Functional coassembly of KCNQ4 with KCNE-beta- subunits in *Xenopus* oocytes." *Cell Physiol Biochem* 18(1-3): 57-66.

**Studier**, F. W. and B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J Mol Biol* 189(1): 113-30.

**Studier**, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn and J. W. Dubendorff (1990). "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." *Methods Enzymol* 185: 60-89.

**Stühmer**, W. (1998). "Electrophysiologic recordings from *Xenopus* oocytes." *Methods Enzymol* 293: 280-300.

**Surti**, T. S., L. Huang, Y. N. Jan, L. Y. Jan and E. C. Cooper (2005). "Identification by mass spectrometry and functional characterization of two phosphorylation sites of KCNQ2/KCNQ3 channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(49): 17828-33.

**Swartz**, K. J. (2004). "Towards a structural view of gating in potassium channels." *Nat Rev Neurosci* 5(12): 905-16.

**Tatulian**, L., P. Delmas, F. C. Abogadie and D. A. Brown (2001). "Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anti-convulsant drug retigabine." *J Neurosci* 21(15): 5535-45.

**Tatulian**, L. and D. A. Brown (2003). "Effect of the KCNQ potassium channel opener retigabine on single KCNQ2/3 channels expressed in CHO cells." *J Physiol* 549(Pt 1): 57-63.

**Terlau**, H. and W. Stuhmer (1998). "Structure and function of voltage-gated ion channels." *Naturwissenschaften* 85(9): 437-44.

**Thompson**, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acids Res* 22(22): 4673-80.

**Tinel**, N., I. Lauritzen, C. Chouabe, M. Lazdunski and M. Borsotto (1998). "The KCNQ2 potassium channel: splice variants, functional and developmental expression. Brain localization and comparison with KCNQ3." *FEBS Lett* 438(3): 171-6.

**Tombola**, F., M. M. Pathak and E. Y. Isacoff (2005). "Voltage-sensing arginines in a potassium channel permeate and occlude cation-selective pores." *Neuron* 45(3): 379-88.

- Tristani-Firouzi, M.** and M. C. Sanguinetti (1998). "Voltage-dependent inactivation of the human K<sup>+</sup> channel KvLQT1 is eliminated by association with minimal K<sup>+</sup> channel (minK) subunits." *J Physiol* 510 (Pt 1): 37-45.
- Tsuruda, P. R., D. Julius** and D. L. Minor, Jr. (2006). "Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel." *Neuron* 51(2): 201-12.
- Verrey, F., J. Loffing, M. Zecevic, D. Heitzmann** and O. Staub (2003). "SGK1: aldosterone-induced relay of Na<sup>+</sup> transport regulation in distal kidney nephron cells." *Cell Physiol Biochem* 13(1): 21-8.
- Wang, Q., M. E. Curran, I. Splawski, T. C. Burn, J. M. Millholland, T. J. VanRaay, J. Shen, K. W. Timothy, G. M. Vincent, T. de Jager, P. J. Schwartz, J. A. Toubin, A. J. Moss, D. L. Atkinson, G. M. Landes, T. D. Connors** and M. T. Keating (1996). "Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias." *Nat Genet* 12(1): 17-23.
- Wang, W., J. Xia** and R. S. Kass (1998). "MinK-KvLQT1 fusion proteins, evidence for multiple Stöchiometries of the assembled IsK channel." *J Biol Chem* 273(51): 34069-74.
- Wehling, C., C. Beimgraben, C. Gelhaus, T. Friedrich, P. Saftig, J. Grotzinger** and M. Schwake (2007). "Self-assembly of the isolated KCNQ2 subunit interaction domain." *FEBS Lett* 581(8): 1594-8.
- Wickenden, A. D., A. Zou, P. K. Wagoner** and T. Jegla (2001). "Characterization of KCNQ5/Q3 potassium channels expressed in mammalian cells." *Br J Pharmacol* 132(2): 381-4.
- Wilson, I. A., H. L. Niman, R. A. Houghten, A. R. Cherenson, M. L. Connolly** and R. A. Lerner (1984). "The structure of an antigenic determinant in a protein." *Cell* 37(3): 767-78.
- Wimmers, S., I. Wulfsen, C. K. Bauer** and J. R. Schwarz (2001). "Erg1, erg2 and erg3 K channel subunits are able to form heteromultimers." *Pflugers Arch* 441(4): 450-5.
- Wollnik, B., B. C. Schroeder, C. Kubisch, H. D. Esperer, P. Wieacker** and T. J. Jentsch (1997). "Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive KVLQT1 K<sup>+</sup> channel mutations found in inherited cardiac arrhythmias." *Hum Mol Genet* 6(11): 1943-9.
- Wu, D. M., L. P. Lai, M. Zhang, H. L. Wang, M. Jiang, X. S. Liu** and G. N. Tseng (2006). "Characterization of an LQT5-related mutation in KCNE1, Y81C: implications for a role of KCNE1 cytoplasmic domain in IKs channel function." *Heart Rhythm* 3(9): 1031-40.
- Xu, X., J. J. Salata, J. Wang, Y. Wu, G. X. Yan, T. Liu, R. A. Marinchak** and P. R. Kowey (2002). "Increasing I(Ks) corrects abnormal repolarization in rabbit models of acquired LQT2 and ventricular hypertrophy." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(2): H664-70.
- Yan, A.** and W. J. Lennarz (2005). "Unraveling the mechanism of protein N-glycosylation." *J Biol Chem* 280(5): 3121-4.

**Yang, W. P., P. C. Levesque, W. A. Little, M. L. Conder, F. Y. Shalaby and M. A. Blonar (1997).** "KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 4017-21.

**Yang, W. P., P. C. Levesque, W. A. Little, M. L. Conder, P. Ramakrishnan, M. G. Neubauer and M. A. Blonar (1998).** "Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy." *J Biol Chem* 273(31): 19419-23.

**Yellen, G., M. E. Jurman, T. Abramson and R. MacKinnon (1991).** "Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K<sup>+</sup> channel." *Science* 251(4996): 939-42.

**Yellen, G. (2002).** "The voltage-gated potassium channels and their relatives." *Nature* 419(6902): 35-42.

**Zerangue, N., Y. N. Jan and L. Y. Jan (2000).** "An artificial tetramerization domain restores efficient assembly of functional Shaker channels lacking T1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3591-5.

**Zollman, S., D. Godt, G. G. Prive, J. L. Couderc and F. A. Laski (1994).** "The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22): 10717-21.

## 8. Veröffentlichungen

Schwake, M., D. Athanasiadu, **C. Beimgraben**, J. Blanz, C. Beck, T. J. Jentsch, P. Saftig and T. Friedrich (2006). "Structural determinants of M-type KCNQ (Kv7) K+ channel assembly." J Neurosci 26(14): 3757-66.

Wehling, C., **C. Beimgraben**, C. Gelhaus, T. Friedrich, P. Saftig, J. Grotzinger and M. Schwake (2007). "Self-assembly of the isolated KCNQ2 subunit interaction domain." FEBS Lett 581(8): 1594-8.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Doktorarbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Inhalt und Form der Arbeit basieren - abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Betreuer - auf den von mir selbst gewonnenen Erkenntnissen.

Vorliegende Teilergebnisse sind nach Absprache mit meinen akademischen Betreuern zur Veröffentlichung eingereicht worden.

Die Doktorarbeit selbst hat aber noch nicht im Rahmen einer Prüfung vorgelegen.

Des weiteren bestätige ich hiermit, dass ich noch keinen Promotionsversuch, weder an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an anderen Universitäten, unternommen habe.

Für die mündliche Prüfung wähle ich die Form der Disputation.

Kiel, 30. Mai 2007

---

(Christian Beimgraben)

## Lebenslauf



Name: **Christian Beimgraben**

Geburtsdatum: **22. April 1976**

Geburtsort: **25524 Itzehoe**

Staatsangehörigkeit: **deutsch**

Familienstand: **ledig**

Wohnungsanschrift: **Holtenuerstrasse 218, 24105 Kiel**

Schulbildung: **1982 – 1986 Grundschule Itzehoe-Wellenkamp  
1986 – 1996 Gymnasium Kaiser-Karl Schule, Itzehoe**

Schulabschluss: **Mai 1996, Abitur**

Wehrdienst: **1. Juli 1996 – 30. Juni 1997  
Freiwillig verlängerter Grundwehrdienst**

Studium: **1. Oktober 1997 bis 1. Juli 2003  
Biologiestudium an der  
Christian-Albrechts Universität, Kiel**

Hochschulabschluss: **Juli 2003, Diplom in Biologie  
Die Diplomarbeit mit dem Titel:  
“Einfluss der Nucleotid-Konzentration auf  
die archaeele Transkription“, wurde am  
Institut für Allgemeine Mikrobiologie der  
Christian-Albrechts Universität, Kiel, ausgeführt.**

Tätigkeiten: **seit Oktober 2003, Doktorarbeit am  
Biochemischen Institut der  
Christian-Albrechts Universität, Kiel**

24105 Kiel, 30. Mai 2007

### Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Paul Saftig für die Vergabe und die Bereitstellung des überaus interessanten Themas und die Möglichkeit an einem sehr gut ausgerüsteten Arbeitsplatz arbeiten zu können.

Ebenfalls möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Dr. Michael Schwake für die stets hilfreiche und unterstützende Betreuung bedanken. ; -) Dankeschön, Micha! (- ;

Ich danke Herrn Professor Markus Bleich vom Physiologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität, sowie allen dortigen Mitarbeitern für die Möglichkeit physiologische Untersuchungen an *Xenopus laevis* Oozyten durchzuführen. Spezieller Dank gebührt dabei Frau Olga Jagodin für die sehr gute Zusammenarbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Katharina Stiebeling. Kathi, ohne Deine ständige Motivation und emotionale Unterstützung, Dein aufmunterndes Lachen und die Späßchen zur richtigen Zeit wäre die Arbeit nur halb so schön gewesen! Weißt Du eigentlich wo ich KCNQ3 in PTLN finde ???

Ich danke Herrn Thorsten Maretzky für den richtigen Tipp zur richtigen Zeit, denn ohne Ihn hätte ich von dieser Promotionsstelle wohl nichts erfahren.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen Kollegen, Karina Reiss, Judith Blanz, Cathrin Claussen, Annette Pachnio, Marion Willenborg, Marc Schulte, Vinayaga Srinivasan Gnanapragassam (Seenu), Alexander Schneede, Andrea Rittger, Jenny Schröder, Christine Schmidt, Julia Schlehe, Mohammed Schomali, Marlies Rusch, Inez Götting, Bjorn Ahrens, Steffi Jessen, Sebastian Held, Jonas Völker, Gundula Hohn, Johann Groth, Wienke Lange und Super Detlef, die mir nicht nur bei thematischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite standen. Wir haben viel zusammen gelacht und es war echt eine schöne Zeit mit Euch! Danke !!!

Es würde wohl den Rahmen sprengen all die restlichen Mitarbeiter des Biochemischen Instituts, sowohl die aus dem Neubau, als auch diejenigen aus dem Altbau hier aufzuzählen, deshalb auch noch an alle die hier nicht namentlich erscheinen ein herzliches Dankeschön für das gute Zusammenwirken.

Natürlich gebührt mein Dank nicht nur meinen Kollegen, sondern besonderen Dank schulde ich auch meiner lieben Schwester Andrea Beimgraben, die mich immer wieder tatkräftig während meines Studiums unterstützt hat. Ich könnte mir keine bessere Schwester wünschen!

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meiner Freundin Dörte Hoffmann, die mir immer hilfreich zur Seite steht, die mich stärkt und unterstützt, die mir stets ein Lachen entlockt, die aber auch immer wieder Geduld beweist und so manchen Abend im Labor tolerierte. Ich danke Dir von Herzen!!

All diesen Menschen bin ich sehr dankbar. Aber am meisten Dank schulde ich meinen Eltern Heinrich und Roswitha Beimgraben. Ihr habt diese Arbeit erst möglich gemacht. Ich hoffe, dass ich das, was Ihr mir gegeben habt, meine Schuld, in irgendeiner Weise irgendwann einmal annähernd zurückgeben kann. Ihr habt mich immer unterstützt, wart immer für mich da. Ihr habt mich so manches gelehrt. Ihr habt immer zu mir gehalten, habt mir Schutz geboten und wart stets geduldig und verständnisvoll. Ich danke Euch für Eure Liebe und Euer Vertrauen.