

Untersuchungen zur Assemblierung der *subunit interaction*-Domäne
der humanen Kaliumkanäle der KCNQ-Familie
insbesondere von *KCNQ2* und *KCNQ3*



Dissertation

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

vorgelegt von
Christina Wehling

Kiel, April 2009

Referent:

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel, den

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungen & Englisches Glossar	5
1 Einleitung	8
1.1 Aufbau und Bedeutung von Ionenkanälen	8
1.1.1 Bedeutung von Ionenkanälen.....	8
1.1.2 Steuerung von Kanälen.....	8
1.1.3 Topologie von Kationenkanälen.....	9
1.1.4 Der Selektivitätsfilter.....	10
1.1.5 Das <i>Gate</i>	11
1.1.6 Der Spannungssensor.....	11
1.1.7 Der elektrochemische Gradient.....	12
1.2 Regulation und Bedeutung der KCNQ-Kaliumkanäle	14
1.2.1 Familien von Kaliumkanälen.....	14
1.2.2 Interaktionen der KCNQ-Untereinheiten.....	15
1.2.3 Expression und Erkrankungen im Zusammenhang mit KCNQ-Kanälen.....	15
1.2.4 Der M-Strom.....	18
1.2.5 Interaktion der KCNQ- mit KCNE-Untereinheiten.....	19
1.3 Bedeutung der carboxyterminalen Region (CTR) für die KCNQ-Kanäle	20
1.3.1 Strukturen und Interaktionen in der CTR.....	20
1.3.2 Assemblierung der α -Untereinheiten.....	22
1.3.3 Die <i>si</i> -Domäne.....	24
1.3.4 Struktur der <i>coiled-coil</i> Domänen.....	25
1.3.5 Vorkommen und Bedeutung der <i>coiled-coil</i> Domänen.....	26
1.4 Fragestellung	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Geräte.....	28
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	29
2.1.3 Kits.....	30
2.1.4 Proteine und Standards.....	30
2.1.5 Chemikalien.....	31
2.1.6 Puffer und Lösungen.....	31
2.1.7 Medien.....	34
2.1.8 Organismen.....	35
2.1.8.1 <i>E. coli</i>	35
2.1.8.2 Hefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	35
2.1.8.3 Krallenfrosch (<i>Xenopus laevis</i>).....	35
2.1.9 Oligonukleotide.....	35
2.1.10 Vektoren und Plasmide.....	36
2.1.10.1 Verwendung in Bakterien.....	36
2.1.10.2 Verwendung in Hefen.....	37
2.1.10.3 Verwendung in <i>Xenopus</i> Oozyten.....	37
2.1.11 Enzyme.....	38
2.1.12 Peptide.....	38
2.1.13 Antikörper.....	39
2.1.14 Programme und Datenbanken.....	39

2.2 Methoden	41
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	41
2.2.1.1 DNA-Techniken	41
2.2.1.1.1 Polymerasekettenreaktion.....	41
2.2.1.1.1.1 <i>Pfu</i> -PCR.....	42
2.2.1.1.1.2 Fusions-PCR.....	42
2.2.1.1.1.3 <i>Taq</i> -PCR.....	44
2.2.1.1.2 Restriktion.....	44
2.2.1.1.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	45
2.2.1.1.4 Gelelution.....	45
2.2.1.1.5 Dephosphorylierung.....	45
2.2.1.1.6 Ligation.....	45
2.2.1.1.7 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	46
2.2.1.1.8 Elektroporation.....	46
2.2.1.1.9 Bakterienanzucht.....	46
2.2.1.1.10 Plasmid-Isolierung.....	47
2.2.1.1.11 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	47
2.2.1.1.12 Sequenzierung.....	47
2.2.1.2 Protein-Techniken	47
2.2.1.2.1 Expression von Protein in Bakterien.....	48
2.2.1.2.2 Bakterienlysis.....	49
2.2.1.2.3 DNase/RNase-Verdau.....	49
2.2.1.2.4 Aufreinigung von Einschlusskörpern.....	49
2.2.1.2.5 Schnelles Verdünnen.....	50
2.2.1.2.6 Aufreinigung über Nickel-Agarose.....	51
2.2.1.2.7 Dialyse.....	51
2.2.1.2.8 Konzentrierung von Proteinlösungen.....	51
2.2.1.2.9 TCA-Fällung.....	52
2.2.1.2.10 Protein- und Peptid-Konzentrationsbestimmung.....	52
2.2.1.2.11 <i>Crosslinking</i>	54
2.2.1.2.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
2.2.1.2.13 Coomassie-Färbung von SDS- oder Blue-Native-PAGE..	55
2.2.1.2.14 Trocknung von SDS- oder Blue-Native-PAGE.....	56
2.2.1.2.15 Western-Blot.....	56
2.2.1.2.16 Ponceau-Färbung von PVDF-Membranen.....	56
2.2.1.2.17 Immunologische Nachweis.....	57
2.2.2 Biochemische Methoden	57
2.2.2.1 Größenausschlusschromatographie (SEC).....	57
2.2.2.2 Zirkularer Dichroismus (CD)-Spektroskopie.....	58
2.2.2.3 Interaktion verschiedener Proteine.....	59
2.2.2.3 Blue-Native-PAGE (BN-PAGE).....	59
2.2.2.4 Massenspektrometrie.....	60
2.2.2.5 Dynamische Lichtstreuung.....	60
2.2.2.6 NMR-Spektroskopie.....	61
2.2.2.7 Kristallisation.....	61
2.2.3 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	61
2.2.3.1 <i>in vitro</i> RNA-Synthese.....	61
2.2.3.2 Kontrolle der RNA.....	62
2.2.3.3 Präparation von <i>Xenopus</i> Oozyten.....	62
2.2.3.4 Injektion von cRNA in <i>Xenopus</i> Oozyten.....	64
2.2.3.5 Messung der Oozyten.....	64

2.2.3.6 Proteinpräparation aus Oozyten.....	66
2.2.4 <i>Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid-System</i>	66
3 Ergebnisse	68
3.1 Sequenzanalyse der <i>si</i>-Domänen der <i>KCNQ</i>-Familie	68
3.2 Herstellung verschiedener Konstrukte der <i>si</i>-Domäne von <i>KCNQ2</i>	69
3.2.1 Klonierung.....	69
3.2.2 Identitätsnachweis der verschiedenen <i>Q2pET30</i> -Konstrukte.....	70
3.3 Analyse der <i>si</i>-Domäne von <i>KCNQ2</i>	71
3.3.1 Löslichkeit und Renaturierung.....	71
3.3.2 Aufreinigung der verschiedenen <i>KCNQ2 si</i> -Domänen.....	72
3.3.3 SEC der Wildtyp <i>si</i> -Domänen von <i>KCNQ2</i>	73
3.3.4 CD-Spektroskopie der Wildtyp <i>si</i> -Domänen von <i>KCNQ2</i>	76
3.4 Analyse mutierter <i>si</i>-Domänen von <i>KCNQ2</i>	77
3.4.1 SEC mutierter <i>si</i> -Domänen von <i>KCNQ2</i>	77
3.4.2 CD-Spektroskopie mutierter <i>si</i> -Domänen von <i>KCNQ2</i>	79
3.4.3 SEC von C-terminal markierten <i>si</i> -Domänen von <i>KCNQ2</i>	80
3.4.4 Blue-Native-PAGE.....	82
3.5 Weitere Eigenschaften der Wildtyp <i>si</i>-Domäne von <i>KCNQ2</i>	84
3.5.1 Strukturaufklärung.....	84
3.5.2 Dynamische Lichtstreuung.....	84
3.5.3 pH-Abhängigkeit der <i>Q2oTpET30 Tetramere</i> und <i>Q2pET30 Tetramere</i>	86
3.5.4 <i>Crosslinking</i> von <i>Q2pET30 Tetrameren</i>	88
3.5.5 Temperaturverhalten von <i>Q2pET30 Tetrameren</i>	90
3.5.6 Einfluss der Calmodulin-Bindestellen auf die <i>si</i> -Domänen von <i>KCNQ2</i> und <i>KCNQ3</i>	92
3.6 Herstellung verschiedener Konstrukte der <i>si</i>-Domäne von <i>KCNQ3</i>	94
3.6.1 Klonierung.....	94
3.6.2 Identitätsnachweis der verschiedenen <i>Q3pET30</i> -Konstrukte.....	95
3.6.3 Löslichkeit und Renaturierung.....	95
3.7 Analyse der <i>si</i>-Domäne von <i>KCNQ3</i>	96
3.7.1 SEC der Wildtyp <i>si</i> -Domäne von <i>KCNQ3</i> bei pH 11.....	96
3.7.2 SEC mutierter <i>si</i> -Domänen von <i>KCNQ3</i> bei pH 11.....	97
3.7.3 Eigenschaften der Wildtyp <i>si</i> -Domäne von <i>KCNQ3</i> bei pH 12.....	99
3.7.4 SEC mutierter <i>si</i> -Domänen von <i>KCNQ3</i> bei pH 12.....	101
3.7.5 CD-Spektroskopie markierter <i>si</i> -Domänen von <i>KCNQ3</i> bei pH 12.....	103
3.8 Analyse der TCC-Peptide von <i>KCNQ3</i>	104
3.8.1 Sequenzanalyse.....	104
3.8.2 SEC der TCC-Peptide von <i>KCNQ3</i>	105
3.8.3 CD-Spektroskopie der TCC-Peptide von <i>KCNQ3</i>	106
3.9 Analyse der HA-markierten Wildtyp <i>si</i>-Domäne von <i>KCNQ3</i>	107
3.9.1 SEC von <i>Q3pET30-HA Dimeren</i> bei pH 11 und pH 12.....	107
3.9.2 Zeitabhängigkeit der Oligomerisierung.....	108
3.9.3 CD-Spektroskopie von <i>Q3pET30-HA Dimeren</i> bei pH 11 und 12.....	109
3.9.4 Temperaturverhalten der <i>Q3pET30-HA Dimeren</i> bei pH 12.....	110
3.10 Interaktion von <i>Q2pET30 Tetrameren</i> und <i>Q3pET30-HA Dimeren</i>	111
3.10.1 Interaktion in 50 mM CAPS pH 12.....	112
3.10.2 Interaktion in 50 mM CAPS pH 11.....	114
3.10.3 CD-Spektren der Interaktionsansätze.....	117
3.11 <i>Molecular Modeling</i>	118
3.12 Deletion der TCC2-Domäne aus <i>KCNQ4</i>	122

3.13 Messung <i>loop</i>-deletierter KCNQ-Kanäle in Oozyten	123
3.13.1 <i>Coiled-coil</i> Vorhersage.....	123
3.13.2 <i>Loop</i> -Deletion in <i>KCNQ1</i>	124
3.13.3 <i>Loop</i> -Deletion in <i>KCNQ2</i>	126
3.13.4 <i>Loop</i> -Deletion in <i>KCNQ3</i>	127
3.13.5 <i>Loop</i> -deletierte <i>KCNQ2/KCNQ3</i> -Heteromeren.....	127
3.14 Messung von <i>KCNQ2</i> Split-Konstrukten in Oozyten	129
4 Diskussion	131
4.1 Die isolierten <i>si</i>-Domänen von <i>KCNQ2</i> und <i>KCNQ3</i>	131
4.1.1 Gewinnung isolierter <i>si</i> -Domänen von <i>KCNQ2</i> und <i>KCNQ3</i> in <i>E. coli</i>	131
4.1.2 Die isolierte <i>si</i> -Domäne von <i>KCNQ2</i> als Tetramerisierungsdomäne.....	132
4.1.3 Die isolierte <i>si</i> -Domäne von <i>KCNQ3</i> als Tetramerisierungsdomäne.....	133
4.1.4 Die <i>si</i> -Domäne als <i>coiled-coil</i>	134
4.1.5 Zur Bedeutung der TCC-Domänen in <i>KCNQ2</i> und <i>KCNQ3</i>	135
4.1.6 Weitere Einflüsse auf die <i>si</i> -Domänen von <i>KCNQ2</i> und <i>KCNQ3</i>	137
4.2 Die TCC-Domänen aller KCNQ-Mitglieder im Vergleich	139
4.2.1 Vergleich der TCC2-Domänen aller KCNQ-Mitglieder.....	139
4.2.2 Vergleich der TCC1-Domänen aller KCNQ-Mitglieder.....	141
4.3 Zur Assemblierung homomerer <i>KCNQ3</i>	142
4.4 Bildung von <i>KCNQ2/KCNQ3</i>-Heteromeren	143
4.4.1 Bildung heteromerer <i>KCNQ2/KCNQ3 si</i> -Domänen.....	143
4.4.2 Interaktion der CTR von <i>KCNQ2</i> und <i>KCNQ3</i>	144
4.4.3 Bildung heteromerer <i>KCNQ2/KCNQ3</i> -Kanäle.....	144
4.4.4 Modell zur Heteromerisierung von <i>KCNQ2</i> und <i>KCNQ3</i>	146
4.5 Die Schleife als flexible Verbindung der TCC-Domänen	147
4.6 Interaktion zwischen KCNQ- und KCNE-Untereinheiten	149
4.7 Ausblick	151
5 Zusammenfassung	152
6 Summary	153
7 Anhang	154
I KCNQ-Aminosäuresequenzen.....	154
II Eichgeraden der SEC.....	159
III Oligonukleotid-Sequenzen.....	160
IV Absorptionskoeffizienten und Molekulargewichte.....	162
8 Literaturverzeichnis	163
9 Eidesstattliche Erklärung	172
10 Lebenslauf und Veröffentlichungen	173
11 Danksagung	174

Abkürzungen

A	Ampere
Å	Ångström ($1\text{Å} = 10^{-10}\text{ m}$)
Abb.	Abbildung
A-Domäne	Assemblierungs-Domäne
AKAP	<i>A-kinase-anchoring protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATFB1	<i>familial atrial fibrillation</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>arbitrary units</i> (Hilfseinheiten)
BFNC	<i>benign familial neonatal convulsions</i>
BN	Blue-Native
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CaBP	Calmodulin-Bindeprotein
CaM	Calmodulin
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure, auch N-Cyclohexylamino-3-aminopropansulfonsäure
CD	Zirkularer Dichroismus
cRNA	<i>copy</i> RNA
CT	Carboxyterminus (C-Terminus)
CTR	carboxyterminale Region
d	Schichtdicke
Da	Dalton (Masseneinheit von Proteinen)
ddNTP	Didesoxynukleotide
deg.	<i>degree</i> , gemessene Elliptizität
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFNA2	<i>dominant nonsyndromic deafness type 2</i>
d.h.	das heißt
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
dt.	deutsch
E	Gleichgewichtspotenzial
E _λ	Absorption bei der Wellenlänge λ
ε _λ	molarer Absorptionskoeffizient des Proteins bei der Wellenlänge λ
e _{AS}	molarer Absorptionskoeffizient einer bestimmten Aminosäure
e _{Pep}	mittlerer molarer Absorptionskoeffizient der Peptidbindung
<i>eag</i>	<i>ether-à-go-go</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Faraday-Konstante oder SI-Einheit der Kapazität (Farad)
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
Ggl.	Gleichung
Gu HCl	Guanidinhydrochlorid, auch Guanidiniumchlorid
HA	Hämagglutinin

Abkürzungen

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HGNC	HUGO <i>Gene Nomenclature Comittee</i>
HMW	<i>High Molecular Weight</i>
IB	<i>inclusion bodies</i> (Einschlusskörper)
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
IUPHAR	<i>International Union of Pharmacology</i>
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen (Länge von Nukleinsäuren)
K _v	spannungsabhängige Kaliumkanäle
L	Liter
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
LQTS	Long-QT-Syndrom
M	Mol oder Meter
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i>
mol	molar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRW	mittlere Molekularmasse der Aminosäurereste eines Proteins
M-Strom	Muskarin-inhibierbarer Strom
M _w	Molekulargewicht
n	Anzahl
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanzspektroskopie)
NT	Aminoterminus (N-Terminus)
NTR	aminoterminaler Region
OD _{λ}	optische Dichte bei Wellenlänge λ
Ω	Ohm (Einheit des elektrischen Widerstandes)
P	Porenregion
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
POD	Peroxidase
PIP ₂	Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
Q	spezifischer Absorptionskoeffizient
R	allgemeine Gaskonstante
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RV	Retentionsvolumen
RWS	Romano-Ward Syndrom
s	Sekunden
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> (Größenausschlusschromatographie)
<i>si</i>	<i>subunit interaction</i>
<i>sid</i>	<i>subunit interaction-Domäne</i> (untereinheitenspezifische Wechselwirkungsdomäne)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
Sulfo-EGS	Ethylenglycol-Bis(sulfosuccinimidylsuccinat)
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure

TCC	tetramerisierungsfähige <i>coiled-coil</i>
T-Domäne	Tetramerisierungsdomäne
TM	Transmembrandomänen
TOF	<i>time-of-flight</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
⊖ ^{MRW}	molare Elliptizität
U	<i>unit</i> (Einheit der enzymatischen Aktivität)
UBP	Ubiquitin-spezifische Protease
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VV	<i>void volume</i> (Ausschlussvolumen)
vgl.	vergleiche
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-galaktopyranosid
z	Valenzladung des Ions
z.B.	zum Beispiel

Einheiten

k	Kilo	10 ³
m	Milli	10 ⁻³
μ	Mikro	10 ⁻⁶
n	Nano	10 ⁻⁹
p	Pico	10 ⁻¹²

Es wurden die Ein- und Drei-Buchstabensymbole für Aminosäuren verwendet.

Englisches Glossar

<i>barrel</i>	Fass
<i>carrier</i>	(Über-)träger
<i>channel</i>	Kanal
<i>channelopathies</i>	Erkrankungen, verursacht durch Dysfunktion von Kanälen
<i>crosslinking</i>	Quervernetzung
<i>forward</i>	vorwärts gerichtet
<i>gain-of-function</i>	Funktionsverstärkung
<i>gate</i>	Durchgang
<i>gating</i>	Taktung
<i>head</i>	Kopf
<i>helical screw</i>	„helikale Schraube“
<i>helical twist</i>	„helikale Drehung“
<i>knobs into hole</i>	Knopf-in-Loch
<i>linker</i>	Verbindungsglied
<i>loop</i>	Schleife
<i>loss-of-function</i>	Funktionsverlust
<i>paddle</i>	Paddel
<i>peak</i>	Signal, Spitze
<i>reverse</i>	rückwärts gerichtet
<i>tail</i>	Schwanz
<i>trafficking</i>	zellulärer Transport und Sortierung von Proteinen
<i>voltage</i>	Spannung

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Bedeutung von Ionenkanälen

1.1.1 Bedeutung von Ionenkanälen

Ionenkanäle spielen bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen eine bedeutende Rolle: Begonnen bei der Akrosomenreaktion der Eizelle nach der Befruchtung durch ein Spermium, oder bei der Regulation der Wasserabgabe über die Spaltöffnungen von Blättern bis zu der Erregung von Neuronen, des Herzens und der Skelettmuskulatur sind spannungsabhängige Ionenkanäle beteiligt. Diese stellen eine Klasse integraler Membranproteine dar, die über die Bildung einer ionenspezifischen Pore den selektiven, passiven Ionentransport durch die Zellmembran gestatten (Hille *et al.*, 1999; Hille, 2001). Dadurch ermöglichen sie den schnellen Transport von kleinen Ionen (besonders Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Cl^-) entlang eines Gradienten und können auf diese Art und Weise deren Konzentrationen schnell verändern.

Die Homöostase des Ionenhaushalts ist für die Funktionalität der Zelle und damit auch für den gesamten Organismus von grundlegender Bedeutung. An der Ausbildung oder Modulation von Konzentrationsgradienten sind unter anderem Kanäle und *Carrier* beteiligt. Letztere können passiv (als erleichterte Diffusion) bzw. aktiv (unter Energieverbrauch) ein oder mehrere Verbindungen mit bzw. gegen einen Konzentrationsunterschied durch die Membran transportieren. Dabei ist ihre Transportrate deutlich geringer als bei den Ionenkanälen. Zusätzlich ermöglicht die Zusammenlagerung von Connexinen in den *gap junctions* die elektrische Kopplung von Zellen und einen schnellen Stoffaustausch über diese relativ großporigen Kanäle.

Das Zusammenspiel von Kanälen, *Carriern* und Connexinen führt zur Ausbildung unterschiedlicher intra- und extrazellulärer Ionenkonzentrationen. Ein Konzentrationsgradient führt dabei stets zur Ausbildung eines Potentials, welches als Antrieb zum Ausgleich wirkt.

1.1.2 Steuerung von Kanälen

Kanäle werden nach der Art ihrer Aktivierung in spannungsabhängige und ligandengesteuerte Typen unterschieden. Ein besonders gut charakterisierter Vertreter der ligandengesteuerten Kanäle ist z.B. der nikotinische Acetylcholinrezeptor an der postsynaptischen Membran von Neuronen im Gehirn, welcher nach Bindung von Acetylcholin einen Na^+ -Einstrom und einen schwächeren K^+ -Ausstrom der Zelle und damit deren Depolarisation ermöglicht (Lindstrom *et al.*, 1987). Spannungsabhängige Kanäle hingegen befinden sich in elektrisch erregbaren Membranen und werden von Veränderungen des Membranpotentials reguliert. Dadurch modulieren sie die Erregbarkeit und sind an der Reizweiterleitung beteiligt (Ashcroft, 2000).

1.1.3 Topologie von Kationenkanälen

Unabhängig von der Art der Steuerung sind Kanäle integrale Membranproteine, welche die Membran mit mehreren Transmembranregionen durchspannen, die reich an hydrophoben Aminosäureseitenketten sind. Die typische Topologie von spannungsabhängigen Kationenkanälen ist bei Natriumkanälen (Noda *et al.*, 1984), Kalziumkanälen (Tanabe *et al.*, 1987) und Kaliumkanälen (Kamb *et al.*, 1987) vergleichbar. Natrium- und Kalziumkanäle bestehen aus vier homologen Domänen (D1 bis D4) (Abb. 1.1 A und B). Diese wiederum werden von jeweils sechs Transmembranregionen (S1 bis S6) gebildet.

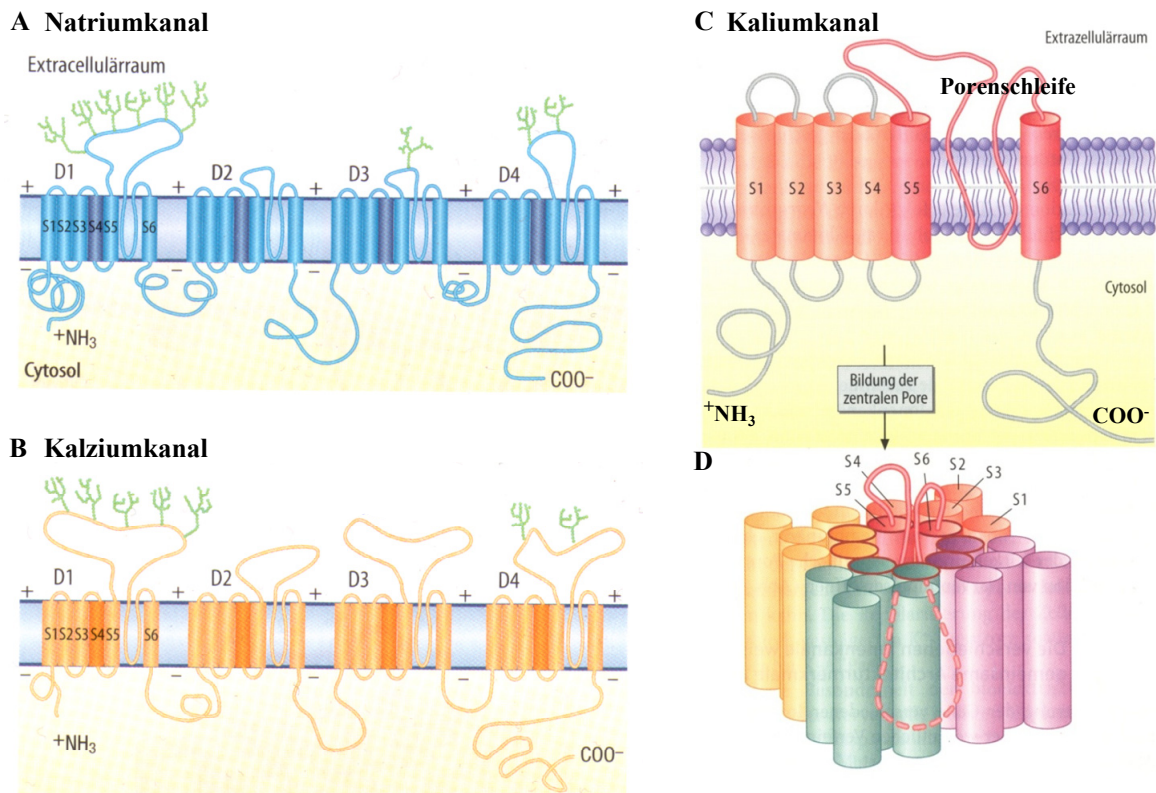


Abb. 1.1: Topologie-Model der spannungsabhängigen Ionenkanäle

Typischer Aufbau eines Natriumkanals (A) und eines Kalziumkanals (B), bestehend aus einer großen Untereinheit mit den vier homologen Domänen D1 bis D4. Im Gegensatz dazu besteht ein funktioneller Kaliumkanal aus vier getrennten Untereinheiten (C), welche sich zu einem funktionellen Tetramer zusammenschließen (D). Die in (C) dargestellte isolierte Untereinheit besteht aus dem Spannungssensor (S1 bis S4; hellrot) und dem porenbildenden Anteil (S5, Porenschleife, S6; dunkelrot). Die in (D) dargestellten vier Untereinheiten sind zur besseren Übersicht verschieden eingefärbt. (Abb. modifiziert nach Löffler & Petrides, 2003.)

Ein funktioneller, spannungsabhängiger Kaliumkanal unterscheidet sich von diesen dadurch, dass er nicht aus einer Polypeptidkette gebildet wird, sondern aus vier getrennten Untereinheiten mit je sechs Transmembranregionen (Abb. 1.1 C). Erst die symmetrische Assemblierung von vier Untereinheiten führt zur Ausbildung eines funktionellen Kanals (Abb. 1.1 D), da die zentrale Pore von allen S5- und den S6-Segmenten, sowie von der diese beiden Transmembranregionen verbindenden Schleife gebildet wird (Durell & Guy, 1992).

Diese Schleife wird deshalb auch Porenschleife genannt. Die Topologie dieses spannungsabhängigen Kanals wird mit 6TM/1P abgekürzt. Dies bedeutet, dass die Untereinheiten aus sechs Transmembranregionen (TM) und einer Porenregion (P) bestehen. Diese Benennung ermöglicht die Differenzierung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle von weiteren Gruppen von Kaliumkanälen. Dazu zählen insbesondere die 2TM/1P Kanäle (Miller, 2000).

1.1.4 Der Selektivitätsfilter

Die Porenregion enthält auch den Selektivitätsfilter, welcher die Spezifität der Ionenkanäle gewährleistet. Abb. 1.2 zeigt den Selektivitätsfilter des bakteriellen Kaliumkanals *KcsA* (Zhou *et al.*, 2001). Dabei handelt es sich um einen einwärts gleichrichtenden 2TM/1P-Kanal. Dieser lässt K^+ -Einwärtsströme wesentlich besser passieren als Auswärtsströme. In der Porenschleife bildet eine etwa 21 Aminosäure lange Peptidsequenz eine β -Haarnadelstruktur aus. Alle vier dieser Sekundärstrukturen in den einzelnen Untereinheiten erzeugen zusammen ein sogenanntes β -barrel (Durell & Guy, 1992). In dieser ist die Konsensussequenz (T/S)xxTxGYG lokalisiert (Hille, 2001), welche bei den meisten Kaliumkanälen konserviert ist. Dabei kann sich an einer x-Position eine beliebige Aminosäure befinden. Die konservierten Aminosäureseitenketten hingegen sind räumlich so koordiniert, dass die Ionen nur unter der Abstreifung ihrer Hydrathülle durch die Pore gelangen können (Doyle *et al.*, 1998). Dadurch, dass sich die Kationen Na^+ , K^+ und Ca^{2+} in ihrer Größe und elektrochemischen Eigenschaften unterscheiden, ergibt sich die Selektivität der Kanäle für ein bestimmtes Ion. Andere Ionen können aber teilweise unspezifisch passieren (Heginbotham *et al.*, 1992; Heginbotham & MacKinnon, 1993).

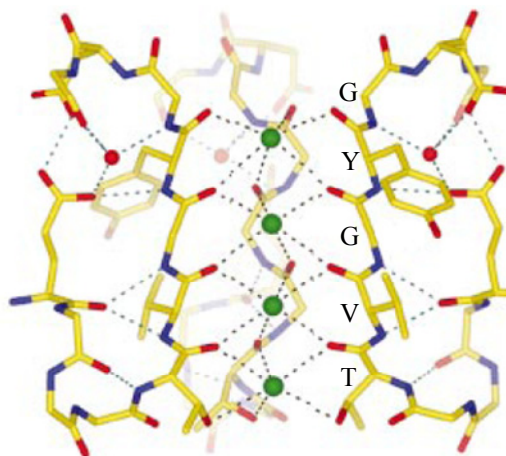


Abb. 1.2: Selektivitätsfilter des bakteriellen Kaliumkanals *KcsA*

Dargestellt sind ein Teil des Peptidrückgrats der Porenschleife (gelb) und die darin enthaltenen Stickstoffatome (blau) und Sauerstoffatome (rot). Die roten Kreise außerhalb der Aminosäurekette stellen Wassermoleküle dar, die die Kaliumionen (grüne Kreise) im Selektivitätsfilter koordinieren. Die Carbonylsauerstoffe des Peptidrückgrades bilden Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelt) zu den Kaliumionen aus und kompensieren so deren Ladung. Die Aminosäureseitenketten der Konsensussequenz sind gekennzeichnet. (Abb. modifiziert nach Zhou *et al.*, 2001.)

1.1.5 Das Gate

Hinter dem Selektivitätsfilter befindet sich das sogenannte *Gate*. Diese engste Stelle verhindert im Ruhezustand den Ionenfluss durch den Ionenkanal und führt daher zur Ausbildung eines inneren Vorhofs. Erst wenn sich das *Gate* öffnet, können die Ionen den Kanal passieren. Das *Gate* wird von einer Biegung in der S6-Helix gebildet (Tombola, 2006). Die Zweiteilung wird dabei entweder von einem Glycin-Gelenk (Perozo *et al.*, 1999) oder einer PVP-Sequenz (del Camino *et al.*, 2000) verursacht. Die beiden Teilsegmente werden auch als S6a- und S6b-Helix bezeichnet (del Camino *et al.*, 2000).

1.1.6 Der Spannungssensor

Sicher scheint indes, dass die Öffnung des Gates durch eine Übertragung der Konformationsänderung des Spannungssensors über die S4-S5 Schleife auf die Porenregion verursacht wird. Der Spannungssensor ist der zweite zentrale Bestandteil der spannungsabhängigen Ionenkanäle und wird von den Segmenten S1 bis S4 gebildet. Dabei ist die vierte Transmembrandomäne, welche eine Anzahl an positiv geladenen Seitenketten von Arginin- oder Lysinresten trägt, besonders bedeutsam (Catterall, 1986).

Wie schon erwähnt, bilden die Zellen im Ruhezustand ein sogenanntes Ruhepotenzial aus, wobei an der Innenseite der Zellmembran ein negativer, auf der Außenseite ein positiver Ladungsüberschuss auftritt (Löffler & Petrides, 2003). Wird bei einer Depolarisation der Zelle diese Ladungsverteilung umgekehrt, so stößt die nun positiv geladene Innenseite der Zellmembran die positiv geladenen Seitenketten des S4-Segmentes ab. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung, welche auf die Porenregion übertragen wird. Der Kanal wird aktiviert, die Pore öffnet sich (Ascroft, 2000). Über die genaue Art der Bewegung des S4-Segmentes wird noch kontrovers diskutiert (Tombola *et al.*, 2006; Elinder *et al.*, 2007) Abb.1.3 stellt drei verschiedene Modelle dar.

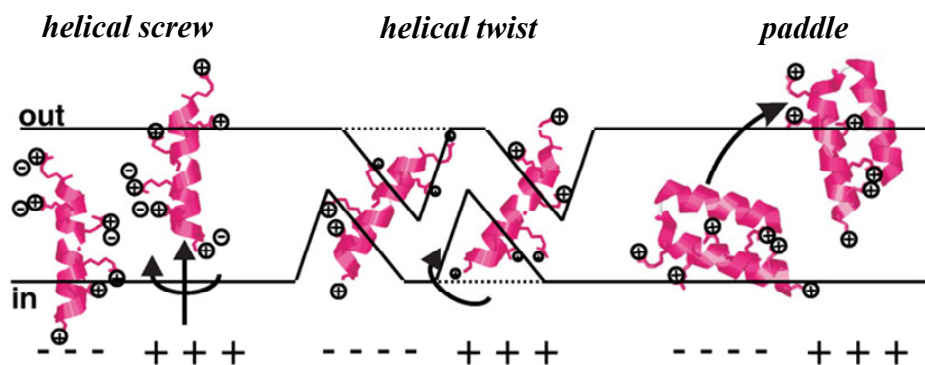


Abb. 1.3: Modelle zur möglichen Bewegung des S4-Segmentes als Spannungssensors
 Es sind jeweils die hypothetischen Lagen im Ruhezustand und bei Depolarisation dargestellt.
 (Abb. aus Elinder *et al.*, 2007.)

Das *helical screw*-Modell beruht auf Ergebnissen von Durell & Guy (1992). Dabei wird für das S4-Segment eine Drehung um die eigene Achse sowie eine transversale Bewegung durch die Membran angenommen. Beim *helical twist*-Modell, nach Cha *et al.* (1999), erfolgt eine Rotation um die eigene Achse. Das S4-Segment ist dabei schräg in die Membran eingelagert und die Ladungsübertragung findet über mit Wasser gefüllte Kavernen statt.

Das *paddle*-Modell beruht auf der Kristallisation des spannungsabhängigen Kaliumkanals KvAP (Jiang *et al.*, 2003 a und b). Dabei interagiert das S4-Segment mit der carboxy-terminalen Region (CTR) der S3-Domäne und formt mit diesem ein Paddel, das sich an der Peripherie des Kanals von der intrazellulären auf die extrazelluläre Seite bewegt. Die Kristallisation des Kv1.2 Kanals der *Shaker*-Familie (Long *et al.*, 2005 a und b) stützt das *paddle*-Modell. Bisher konnte noch kein einheitliches Modell für den Spannungssensor entwickelt werden (Tombola, 2006).

Nach der Aktivierung des Kanals über den Spannungssensor, wird dieser durch eine weitere Konformationsänderung wieder geschlossen. Die inaktivierten Kanäle unterscheiden sich dabei vom geschlossenen Zustand (Ashcroft, 2000). Dadurch entsteht eine sogenannte Refraktärzeit, in welcher der Kanal nicht aktivierbar ist und der geschlossene inaktive Kanal wieder in die geschlossene aktivierbare Konformation über geht. Der genaue Vorgang der Inaktivierung ist noch nicht vollständig verstanden.

Interessanterweise ist der Spannungssensor in der beschriebenen Form nicht nur für Ionenkanäle bekannt. Murata *et al.* (2005) haben in der Seescheide *Ciona intestinalis* das Protein *Ci-VSP* beschrieben. Dieses beinhaltet ebenfalls einen Spannungssensor, welcher das Membranpotenzial an die Aktivität einer Phosphoinositid-Phosphatase koppelt.

1.1.7 Der elektrochemische Gradient

Die physikalische Grundlage für die Ionenströme bildet der elektrochemische Gradient, welcher sich aus dem chemischen und dem elektrischen Gradienten zusammensetzt. Der chemische Gradient wird durch unterschiedliche Konzentrationen verursacht. Er führt zu einem Fluss von der höheren zu einer niedrigeren Konzentration der jeweiligen Verbindung, welcher erst beim Ausgleich dieses Unterschiedes zum Erliegen kommt (Ashcroft, 2000).

Der elektrische Gradient wird von unterschiedlichen Ladungen gebildet. Die Nettoladung ergibt sich aus der Summe aller geladenen Teilchen (im jeweiligen Kompartiment). Diese können sowohl positiv als auch negativ sein. Unterschiede in der Nettoladung führen zu einem Ionenfluss, bis das elektrische Potenzial ausgeglichen ist und die Nettoladung Null beträgt (Ashcroft, 2000).

Da Ionen von Orten mit gleichnamiger Ladung abgestoßen werden, kann dieses unter Umständen dazu führen, dass die Ionen trotz der Anwesenheit eines chemischen Gradienten diesem nicht folgen können, weil ein elektrischer Gradient dem chemischen Gradienten entgegen wirkt (Ashcroft, 2000). Dadurch bildet sich ein sogenanntes Gleichgewichtspotenzial aus. In diesem heben sich die chemischen und die elektrischen Kräfte, die auf die Ionen wirken, gegenseitig auf.

Das Gleichgewichtspotenzial befindet sich in der Regel nicht bei der Nettoladung von Null, vielmehr findet kein Nettofluss der Ionen statt. Das Gleichgewichtspotenzial ist also als diejenige Spannung zu verstehen, bei der ein elektrisches Potenzial ein Fließen der Ionen zum Ort der geringeren Konzentration verhindert. Dieses Gleichgewicht ist dabei nicht statisch, sondern dynamisch. Tab. 1.1 gibt die typischen Ionenkonzentrationen und die Gleichgewichtspotenziale der wichtigsten Ionen wieder.

	Extrazelluläre Konzentration (mM)	Intrazelluläre Konzentration (mM)	Gleichgewichtspotenzial (mV)
Na ⁺	135-145	12	+66
K ⁺	3,5-5	140	-93
Ca ²⁺	2,25-2,52	10 ⁻⁷ M (frei)	+135
Cl ⁻	115	2,5-50	-42

Tab. 1.1: Ionenkonzentrationen und Gleichgewichtspotenziale ausgewählter Ionen

Die extrazelluläre Konzentrationen beziehen sich auf humanes Blut, die intrazelluläre Konzentration sind typisch für Säugerzellen. (Abb. modifiziert nach Ashcroft, 2000.)

Der überwiegende Teil der Na⁺-Ionen ist genau wie der der Ca²⁺-Ionen extrazellulär lokalisiert. Im Gegensatz dazu liegt innerhalb der Zelle eine deutlich größere Konzentration von K⁺-Ionen vor. Dies bedeutet, dass sich beim Öffnen entsprechender Kanäle ein Natriumeinstrom in und ein Kaliumausstrom aus der Zelle bildet. Die Kaliumkanäle sind in der Regel an der Repolarisation einer Zelle nach ihrer Erregung beteiligt.

Das Gleichgewichtspotenzial kann nach der Nernst-Gleichung (Ggl. 1.1) berechnet werden, welche von Walter Nernst 1889 zuerst beschrieben wurde. Wird diese für 5 mM intrazelluläre und 140 mM extrazelluläre Kaliumionen-Konzentrationen bei 37°C berechnet, so ergibt sich ein Gleichgewichtspotenzial von -93 mV. Da die meisten Zellen ein Ruhepotenzial von -60 bis -100 mV haben, ist dies ein Hinweis darauf, dass das Ruhepotenzial vor allem von Kaliumionen und -kanälen bestimmt wird (Ashcroft, 2000).

$$E = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{c_{\text{innen}}}{c_{\text{außen}}}$$

Ggl. 1.1: Die Nernst-Gleichung

E: Gleichgewichtspotenzial; R: allgemeine Gaskonstante; T: Temperatur; z: Valenzladung des Ions; F: Faraday-Konstante; c_{innen}: intrazelluläre Konzentration; c_{außen}: extrazelluläre Konzentration

1.2 Regulation und Bedeutung der KCNQ-Kaliumkanäle

1.2.1 Familien von Kaliumkanälen

Es sind etwa 70 Loci für Kaliumkanäle im Säuger genom bekannt (Gutman *et al.*, 2005). Die größte Gruppe stellt beim Menschen die der spannungsabhängigen Kaliumkanäle (auch K_v -Kanäle, von *voltage* (dt. Spannung)) mit etwa 40 Genen dar. Abb. 1.4 zeigt deren systematische Einteilung, welche auf dem Vergleich der Aminosäuresequenzen der Transmembrandomänen S1 bis S6 beruht.

Diese Diversität der Kaliumkanäle erhöht sich außerdem dadurch, dass neben homomeren Kanälen, welche aus vier gleichen Untereinheiten bestehen, auch heteromere Tetramere ausgebildet werden können. Diese enthalten unterschiedliche Untereinheiten, meist aus der gleichen Familie, wodurch die Eigenschaften der Kaliumkanäle modifiziert werden können (Gutman *et al.*, 2005).

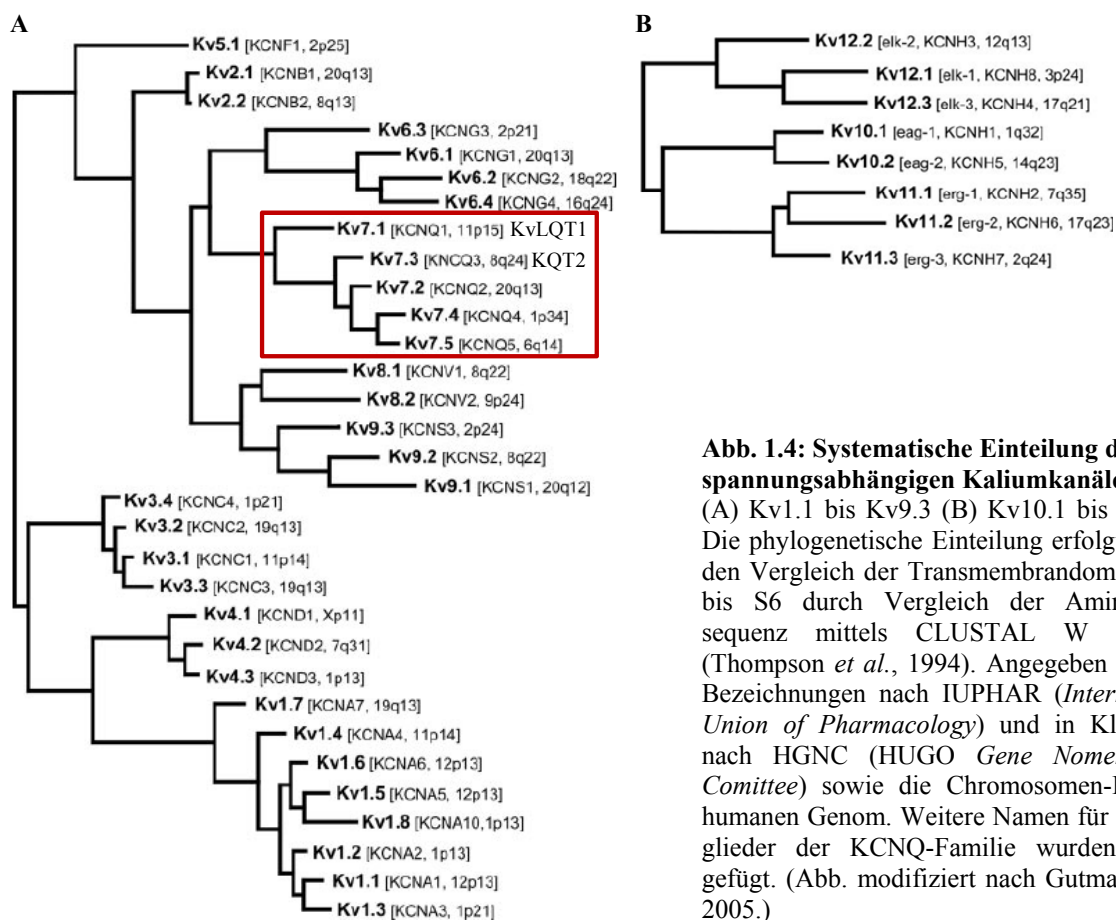


Abb. 1.4: Systematische Einteilung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle (A) Kv1.1 bis Kv9.3 (B) Kv10.1 bis Kv12.2. Die phylogenetische Einteilung erfolgte durch den Vergleich der Transmembrandomänen S1 bis S6 durch Vergleich der Aminosäuresequenz mittels CLUSTAL W Analyse (Thompson *et al.*, 1994). Angegeben sind die Bezeichnungen nach IUPHAR (*International Union of Pharmacology*) und in Klammern nach HGNC (*HUGO Gene Nomenclature Committee*) sowie die Chromosomen-Loci im humanen Genom. Weitere Namen für die Mitglieder der KCNQ-Familie wurden hinzugefügt. (Abb. modifiziert nach Gutman *et al.*, 2005.)

1.2.2 Interaktionen der KCNQ-Untereinheiten

Eine Familie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle sind die langsam aktivierbaren KCNQ-Kanäle, oder auch Kv7-Kanäle, welche aus den fünf Mitgliedern *KCNQ1* bis *KCNQ5* bestehen (Gutman *et al.*, 2005). Für diese gibt Tab. 1.2 eine Übersicht über die bisher beschriebenen Interaktionen. Dabei sind alle Familienmitglieder in der Lage, funktionelle Homomere auszubilden (Wang *et al.*, 1996; Biervert *et al.*, 1998; Kubisch *et al.*, 1999; Lerche *et al.*, 2000; Schwake *et al.*, 2000). Bis auf *KCNQ1* können alle anderen KCNQ-Untereinheiten zusätzlich Heteromere auszubilden (Jentsch, 2000). Dabei erfolgt die Heteromerisierung häufig mit *KCNQ3*, welches das breiteste Interaktionsspektrum in Bezug auf andere KCNQ-Mitglieder hat. Aber auch *KCNQ4/KCNQ5*-Heteromere sind bekannt (Bal *et al.*, 2008 a). Im folgenden Kapitel werden die bisher bekannten Oligomere näher beschrieben.

	KCNQ1	KCNQ2	KCNQ3	KCNQ4	KCNQ5
KCNQ1	+				
KCNQ2		+	+		
KCNQ3		+	+	+	+
KCNQ4			+	+	+
KCNQ5			+	+	+

Tab. 1.2: Interaktionen der KCNQ-Untereinheiten

Dargestellt sind alle bisher nachgewiesenen *in vitro* Interaktionen, unabhängig von ihrer physiologischen Relevanz.

Die KCNQ-Mitglieder stellen sogenannte α -Untereinheiten der Kaliumkanäle dar. Sie sind zur Ausbildung eines funktionellen Kanals unerlässlich. Diese können aber noch durch β -Untereinheiten weiter in ihren Eigenschaften verändert werden. Im Falle der KCNQ-Familie sind dies die KCNE-Proteine, auf die in Kap. 1.2.5 noch weiter eingegangen wird. Die Diversität der KCNQ-Kanäle wird außerdem durch unterschiedliche Spleißvarianten erhöht (Smith *et al.*, 2001; Yeung *et al.*, 2008). Die Expression der Kaliumkanal-Untereinheiten erfolgt gewebespezifisch und kann sich auch im Laufe der Entwicklung verändern (Okada *et al.*, 2003; Kanaumi *et al.*, 2008).

1.2.3 Expression und Erkrankungen im Zusammenhang mit KCNQ-Kanälen

KCNQ1 wurde als erstes Mitglied der KCNQ-Familie von Wang *et al.* (1996) beschrieben. Diese zeigten, dass Mutationen in *KCNQ1* ein Long-QT-Syndrom (LQTS) verursachen können. Diese Form der erblichen Herzrhythmusstörung, auch Romano-Ward Syndrom (RWS) genannt, kann zum plötzlichen Tod führen. Grund dafür ist, dass die Repolarisationsphase des Herzens verspätet einsetzt, sichtbar in einem verlängerten QT-Intervall im Elektrokardiogramm (EKG) (Attali, 2002). Die Benennung der KCNQ-Kanäle leitet sich im

Übrigen von dieser Erkrankung ab, wobei K für Kalium, CN für channel (dt. Kanal) und Q für das QT-Intervall steht.

Mutationen in *KCNE1* können den gleichen pathophysiologischen Phänotyp wie Mutationen in *KCNQ1* verursachen. Der Grund dafür ist, dass der dabei an der Repolarisation des Herzens beteiligte sogenannte I_{KS} -Strom von einem Komplex des *KCNQ1*-Kanals mit *KCNE1* gebildet wird (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996). Es sind verschiedene Mutationen beim Menschen bekannt, welche zu einer dominanten oder einer rezessiv vererbaren Form führen (Jentsch, 2000).

Eine Form des LQTS tritt auch in Verbindung mit einem fortschreitenden Ertauben ein, dem Jervell-und-Lange-Nielsen Syndrom (JLNS). Dies beruht darauf, dass der *KCNQ1/KCNE1*-Komplex auch in der *Stria vascularis* des Innenohrs exprimiert wird (Neyroud *et al.*, 1997; Splawski *et al.*, 1997) und dort für die K^+ -Sekretion in die Endolymphe bedeutend ist. *KCNQ1* kann auch mit *KCNE3* Heteromere ausbilden, welche an der K^+ -Sekretion der Kryptenzellen des Darms, beteiligt sind (Schroeder *et al.*, 2000 a). Das LQTS zeigt die Bedeutung der β -Untereinheiten für die Funktion der KCNQ-Kanäle auf.

Neben *loss-of-function* Mutationen können auch *gain-of-function* Mutationen in *KCNQ1* das Aktionspotenzial des Herzens verändern und zu AFB1 (*familial atrial fibrillation*), einer dominant erblichen Form des Vorhofflimmerns, führen (Chen *et al.*, 2003 a).

Desweiteren wurden unlängst in zwei Genom-weiten Assoziationsstudien Hinweise auf eine Korrelation zwischen bestimmten SNPs (*single nucleotide polymorphism*) in *KCNQ1* und Typ II-Diabetes (Yasuda *et al.*, 2008; Unoki *et al.*, 2008) gefunden. Eine Bestätigung der unmittelbaren Beteiligung von *KCNQ1* bei dieser Erkrankung steht allerdings noch aus.

KCNQ1 wurde auch in Geschmacksknospen von Säugern nachgewiesen, wobei die Untersuchung von *KCNQ1 knock-out* Mäusen keine deutlich krankhafte Veränderung des Geschmackssinn ergeben hat (Wang *et al.*, 2009).

KCNQ2 und *KCNQ3* wurden ebenfalls im Zusammenhang mit einer Erkrankung beschrieben (Biervert *et al.*, 1998; Charlier *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998). Die *benign familial neonatal convulsions* (BFNC) ist eine dominant vererbare Form der Neugeborenenepilepsie. Die epileptischen Anfälle beginnen dabei für gewöhnlich in der ersten Lebenswoche und hören in den folgenden 6 Monaten spontan wieder auf; etwa 10 bis 16 % der Betroffenen leiden allerdings auch in ihrem späteren Leben unter epileptische Anfällen (Li *et al.*, 2008).

Dabei konnten die molekulargenetischen Grundlagen dieser Erkrankung wie auch funktionelle Studien zeigen, dass das molekulare Korrelat des für die Krankheit

verantwortlichen K_V -Kanals ein *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromer ist (Schroeder *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998 a). Die Mutation einer der beiden unterschiedlichen Untereinheiten ist für die Ausbildung von BFNC ausreichend. Der neuronalen Ausprägung entsprechend werden diese Kaliumkanal-Untereinheiten hauptsächlich im Gehirn exprimiert.

Die Rolle von K_V -Kanälen bei diesen Erkrankungen ergibt sich dadurch, dass diese im Nervengewebe, im Herzmuskel und in der glatten Muskulatur während der Repolarisationsphase des Aktionspotenzials aktiv sind (Ashcroft, 2000). Erst durch den Ausstrom von K^+ -Ionen durch die entsprechenden Kaliumkanäle wird das Ruhepotenzial der Zelle wiederhergestellt. Kommt es dabei z.B. durch eine Mutation von *KCNQ2* oder *KCNQ3* zu einer Verringerung der funktionsfähigen K_V -Kanäle, dann kann dadurch auch die Repolarisation verzögert werden und eine Übererregung auftreten (Schroeder *et al.* 1998; Wang *et al.*, 1998 a).

Das Expressionsmuster von *KCNQ2* überschneidet sich zwar mit dem von *KCNQ3* (Cooper *et al.*, 2000), es konnten aber auch *KCNQ2* Homomere *in vivo* nachgewiesen werden (Devaux *et al.*, 2004; Schwarz *et al.*, 2006). Die gezielte Deaktivierung von *KCNQ2* in Mäusen ist lethal (Watanabe *et al.*, 2000). Homozygote Mäuse sterben wenige Stunden nach der Geburt an Atelektase, einem Kollaps von Lungenabschnitten. Heterozygote *KCNQ2* Mäuse sind morphologisch unauffällig, zeigen aber eine verstärkte Sensitivität gegenüber Pentylentetrazol, einer Substanz, die epileptische Anfälle auslösen kann.

KCNQ3 kann ebenfalls Homomere ausbilden, deren Oberflächenexpression allerdings gering ist (Schwabe *et al.*, 2000). *KCNQ3 knock-out* Mäuse sind im Gegensatz zu *KCNQ2 knock-out* Mäusen lebensfähig (Tzingounis & Nicoll, 2008), ihr neurologischer Phänotyp aber noch nicht beschrieben.

KCNQ4 wird in bestimmten Zellen des Innenohres und Neuronen des auditorischen Systems exprimiert (Kubisch *et al.*, 1999; Kharkovets *et al.*, 2000). Mutationen darin können entsprechend des Expressionsmusters die dominant vererbliche Taubheitsform DFNA2 (*dominant nonsyndromic deafness type 2*) verursachen (Kubisch *et al.*, 1999), da es offenbar an der Wiederaufnahme der K^+ -Ionen in die äußeren Haarzellen des Innenohrs beteiligt ist.

Bal *et al.* (2008 a) konnten außerdem die Bildung von *KCNQ4/KCNQ5*-Heteromeren *in vitro* nachweisen. *KCNQ5* wurde auch in der glatten Muskulatur von Blutgefäßen in Form einer Spleißvariante nachgewiesen (Yeung *et al.*, 2008). Auch *KCNQ1* und eine Spleißvariante davon sind offenbar an der Erregung der Gefäßmuskulatur beteiligt (Ohya *et al.*, 2003).

Die physiologische Bedeutung der KCNQ-Kanäle wird bei der Beschreibung der von Ihnen verursachten Dysfunktionen (*channelopathies*) deutlich. Erkrankungen, die auf Veränderungen von *KCNQ5* beruhen, sind bisher nicht beschrieben worden. Ob Mutationen in diesem Gen physiologisch unbedeutend oder aber früh lethal sind, ist noch ungeklärt. Tab. 1.3 (nach Jentsch, 2000) gibt einen Überblick über die möglichen funktionell bzw. physiologisch relevanten KCNQ-Homo- bzw. Heteromere und deren Möglichkeiten zur Komplexbildung mit KCNE- β -Untereinheiten, soweit sie für die Ätiologie bekannter Erbkrankheiten wichtig sind.

Gen	Expression	Bindungspartner	Erkrankung	Vererbung
KCNQ1	Herz, Innenohr, Darm	KCNE1, KCNE3	LQTS (dominates RWS)	dominant
			LQTS (rezessives RWS)	rezessiv
			LQTS+Taubheit (JLNS)	rezessiv
			ATFB1	dominant
KCNQ2	Gehirn	KCNQ3	BFNC	dominant
KCNQ3	Gehirn	KCNQ2, -4 und -5	BFNC	dominant
KCNQ4	Innenohr	KCNQ3	DFNA2	dominant
KCNQ5	Gehirn, Muskel	KCNQ3	?	

Tab. 1.3: Erkrankungen im Zusammenhang mit KCNQ-Kanälen

LQTS: Long-QT-Syndrom; RWS: Romano-Ward Syndrom; JLNS: Jervell-und-Lange-Nielsen Syndrom; ATFB1: *familial atrial fibrillation*; BFNC: *benign familial neonatal convulsions*; DFNA2: *dominant nonsyndromic deafness type 2*. Mutationen in *KCNE1* verursachen den gleichen pathophysiologischen Phänotyp wie für *KCNQ1* beschrieben. (Tab. modifiziert nach Jentsch, 2000.)

1.2.4 Der M-Strom

Bei der Erregungsübertragung im Gehirn sind unterschiedliche Acetylcholin-Rezeptoren beteiligt, welche ungleich sensitiv für verschiedene Agonisten sind. Während die nikotinerge Stimulation zu einer erhöhten Membranleitfähigkeit führt, führt die muskarinerge Stimulation zu einer verminderten Kaliumleitfähigkeit. Der sogenannte M-Strom wird von spannungsabhängigen Kaliumkanälen gebildet und durch die muskarinerge Stimulation der Neuronen inhibiert (Brown & Adams, 1980). Er verlangsamt die neuronale Erregung, verändert das Erregungsmuster der Neuronen und zeigt keine Inaktivierung (Wang *et al.*, 1998 a).

Die *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromeren bilden im Gehirn einen Teil dieses M-Stromes aus (Wang *et al.*, 1998 a). Schroeder *et al.* (1998) und Cooper *et al.* (2000) konnten außerdem die Lokalisation von *KCNQ2* und *KCNQ3* in bestimmten Regionen des menschlichen Gehirns nachweisen. Die Koexpression von *KCNQ2*- und *KCNQ3*-Kanälen in *Xenopus* Oozyten (Abb. 1.5) führt zu mehrfach erhöhten Strömen im Vergleich zur alleinigen Expression der jeweiligen Homomere (Schroeder *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998 a). Dieses Verhalten konnte im Wesentlichen durch eine größere Zahl aktiver heteromerer Kanäle an der Zelloberfläche im Vergleich zu homomeren *KCNQ2*- und *KCNQ3*-Kanälen erklärt werden (Schwake *et al.*, 2000).

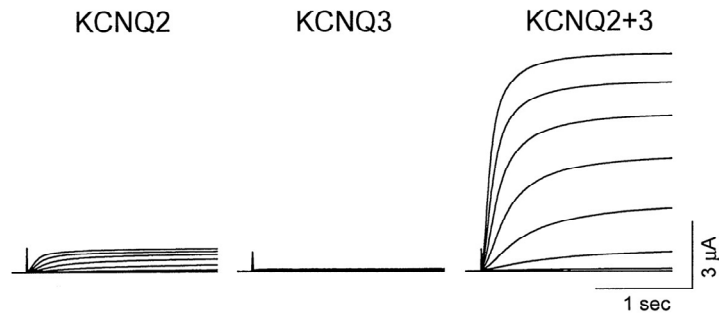


Abb. 1.5: Ströme von *KCNQ2* Homomeren, *KCNQ3* Homomeren und *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromeren
KCNQ3 verursacht im Vergleich zu *KCNQ2* nur sehr geringe Ströme. Die Koexpression beider Proteine führt zur Ausbildung von heteromeren Kanälen mit vielfach verstärkter Stromamplitude. (Abb. aus Wang *et al.*, 1998 a.)

Der native M-Strom wird aber nicht nur von *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromeren ausgebildet. Lerche *et al.* (2000) haben für *KCNQ5* festgestellt, dass sich auch dessen Strom von Linopirdin, einem künstlichen, selektiven Inhibitor der KCNQ-Kanäle, blockieren lässt. Außerdem verstärkte die Koexpression von *KCNQ5* mit *KCNQ3* die in *Xenopus* Oozyten gemessene Amplitude um das 4- bis 5-fache und die Heteromeren wiesen eine verlangsamte Aktivierung auf. Schroeder *et al.* (2000 b) konnten darüber hinaus zeigen, dass sich die Verteilung der *KCNQ5* mRNA im Gehirn mit der von *KCNQ2* und *KCNQ3* überschneidet. Damit könnten auch *KCNQ5/KCNQ3* Heteromere am M-Strom beteiligt sein.

Auch *KCNQ4* kann mit *KCNQ3* Heteromere in *Xenopus* Oozyten ausbilden, welche ebenfalls sensitiv gegenüber Linopirdin sind (Kubisch *et al.*, 1999). Neben dem Auftreten in den äußeren Haarzellen des Innenohrs wird *KCNQ4* noch in einigen Neuronen des auditorischen Systems exprimiert (Kharkovets *et al.*, 2000). Da sich dieses Expressionsmuster deutlich von dem von *KCNQ3* unterscheidet, ist unklar in wieweit *KCNQ4/KCNQ3*-Kanäle *in vivo* eine Rolle spielen.

1.2.5 Interaktion der KCNQ- mit KCNE-Untereinheiten

Von den als β -Untereinheiten agierenden KCNE-Proteinen sind bisher ebenfalls 5 Mitglieder entdeckt worden (McCrossan & Abbott, 2004). Das Heteromer aus *KCNQ1* mit *KCNE1* wurde bereits beim LQTS beschrieben. Da *KCNE1* in diesem Zusammenhang auch als *MinK* bekannt ist, werden die übrigen KCNE-Proteine auch *MinK-related peptides (MiRPs)* genannt. Bei diesen handelt es sich um Typ I-Transmembranproteine, welche also eine intrazelluläre carboxyterminale Region (CTR) aufweisen. Die Interaktion mit KCNE-Proteinen verändert die charakteristischen Eigenschaften der KCNQ-Kanäle in unterschiedlicher Weise. Die bisher bekannten Interaktionen sind in Tab. 1.4 zusammengefasst.

Die Assemblierung zwischen den α - und den β -Untereinheiten erfolgt spezifisch. Bei den *KCNQ1/KCNE1*-Kanälen des I_{KS} -Stromes wird dabei eine 4:2 Stöchiometrie angenommen (Chen *et al.*, 2003 b). Die räumliche Lage der Interaktion zwischen den α - und β -Untereinheiten ist noch nicht aufgeklärt. Kang *et al.* (2008) beschreiben im geschlossenen Zustand eine Interaktion der Transmembrandomäne von *KCNE1* mit der Schleife zwischen dem S4- und S5-Segment von *KCNQ1*, welche den Spannungssensor mit der Porendomäne verbindet. Im offenen Zustand liegt unter anderem eine Interaktion der Transmembranregion von *KCNE1* mit einem S5- und einem S6-Segment vor. Panaghie *et al.* (2006) wiesen bereits auf die Bedeutung der S6-Helix von *KCNQ1* für die Interaktion mit *KCNE1* und *KCNE2* hin.

	KCNQ1	KCNQ2	KCNQ3	KCNQ4	KCNQ5
KCNE1	+ ¹	+ ⁶	+ ⁶	+ ⁸	
KCNE2	+ ²	+ ⁷	+ ⁷	+ ⁸	
KCNE3	+ ³			+ ⁸	
KCNE4	+ ⁴			+ ⁸	
KCNE5	+ ⁵			+ ⁸	

Tab. 1.4: Interaktionen der KCNQ- mit KCNE-Untereinheiten

Dargestellt sind alle bisher nachgewiesenen *in vitro* Interaktionen, unabhängig von ihrer physiologischen Relevanz.¹ Sanguinetti *et al.*, 1996; ² Tinel *et al.*, 2000 a; ³ Schroeder *et al.*, 2000 a; ⁴ Grunnet *et al.*, 2002; ⁵ Angelo *et al.*, 2002; ⁶ Yang *et al.*, 1998 (bei *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromeren); ⁷ Tinel *et al.*, 2000 b (bei *KCNQ2*-Homomeren und *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromeren); ⁸ Strutz-Seeböhm *et al.*, 2006.

1.3 Bedeutung der carboxyterminalen Region (CTR) für die KCNQ-Kanäle

1.3.1 Strukturen und Interaktionen in der CTR

Im Allgemeinen dienen die zytosolische Bereiche von Proteinen häufig der Regulation ihrer Aktivität und der Interaktion mit anderen Proteinen. Auch für die CTR von KCNQ-Kanälen sind zahlreiche Interaktionspartner bekannt. Abb. 1.6 zeigt eine Übersicht über bekannte Strukturen und Interaktionen in diesem Bereich.

Unter anderem wurde dabei von Yus-Najera *et al.* (2002) in der Helix A aller KCNQ-Mitglieder ein unvollständiges IQ-Motiv identifiziert. Das IQ-Motiv bildet eine bekannte Calmodulin (CaM)-Bindestelle aus. Von dessen Konsensussequenz IQxxxRxxxxxR, wobei sich an einer x-Position eine beliebige Aminosäure befinden kann, fehlt dabei nur das endständige Arginin in den KCNQ- α -Untereinheiten. Desweiteren wurden zwei einander überlagernde 1-5-10-Motive in der Helix B (vgl. Abb. 1.6) gefunden (Yus-Najera *et al.*, 2002). Die Zahlen stehen dabei für die Position der konservierten, hydrophoben Aminosäuren in der Sequenz der CaM-Bindungsdomäne. Damit enthalten die CTR aller KCNQ-Mitglieder eine diskontinuierliche CaM-Bindungsstelle.

Auch Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) kann auf alle KCNQ-Mitglieder wirken (Zhang *et al.*, 2003) und bindet diese an die muskarinerge Signalkaskade an (Li *et al.*, 2005). Die genaue Bindestelle ist dabei unklar (Zhang *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005), allerdings konnten Kwon *et al.* (2007) zeigen, dass PIP₂ die Affinität von CaM zu seiner Bindestelle in *KCNQ1* verringert.

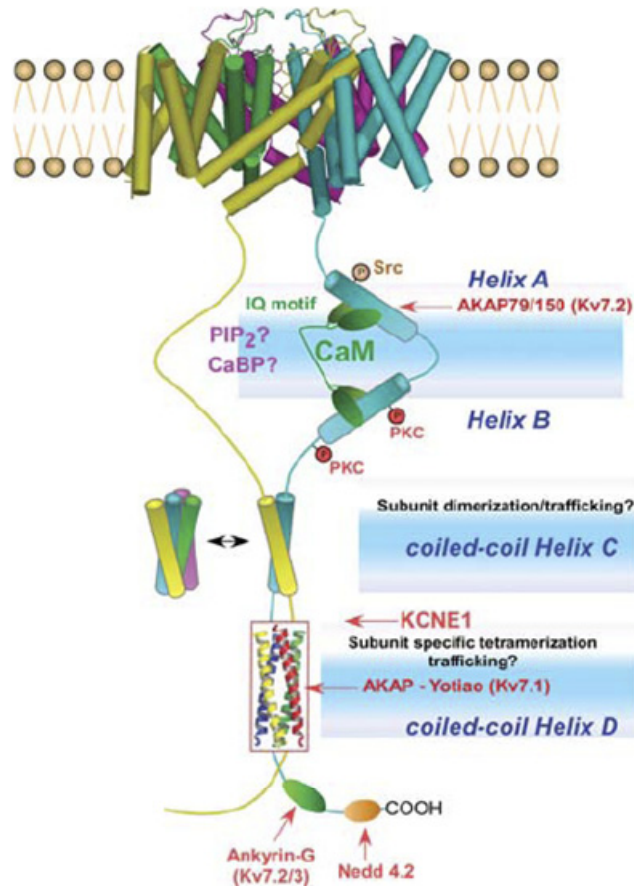


Abb. 1.6: Übersicht über die Strukturen und Interaktionen in der CTR von *KCNQ1*

CaM: Calmodulin, Src: eine Tyrosinkinase, PIP₂: Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat, CaBP: *Calmodulin binding protein*, PKC: Proteinkinase C; AKAP: *A-kinase-anchoring protein*. (Abb. aus Haitin & Attali, 2008.)

Die Helices C und D (vgl. Abb. 1.6) bilden *coiled-coil* Domänen aus (Kanki *et al.*, 2004; Schwake *et al.*, 2006; Howard *et al.*, 2007; Wiener *et al.*, 2008), dessen charakteristische Eigenschaften in Kap. 1.3.4 noch eingehend beschrieben werden. Die Untersuchung dieser Strukturen ist unter anderem Thema der vorliegenden Arbeit.

In der Helix D (vgl. Abb. 1.6) von *KCNQ1* konnten Marx *et al.* (2002) für ein Leucin-Zipper-Motiv die Interaktion mit dem Zielsteuerungsprotein *Yotiao* zeigen, welches ebenfalls als *A-kinase-anchoring protein* (AKAP) eine Wechselwirkung mit der Proteinkinase A und letztendlich die Regulation durch β -adrenerge Rezeptoren vermittelt.

Die CTR von *KCNQ2* kann über ein weiteres Protein (*AKAP79/150*) mit der Proteinkinase C (PKC) wechselwirken (Hoshi *et al.* 2003). Die Aktivierung der PKC führt zur dabei zur Phosphorylierung von zwei Serinresten in bzw. bei der Helix B.

KCNQ3-, *KCNQ4*- und *KCNQ5*-Homomere, *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromere sowie der native M-Strom können außerdem von der Tyrosin-Kinase *Src* moduliert werden, wodurch sich die von ihnen verursachten Ströme verringern (Gamper *et al.*, 2003). Ströme die auf *KCNQ1* oder *KCNQ2* Homomeren basieren, werden nicht verändert.

Ferner wurde die für die Oberflächenexpression von *KCNQ1* (Jespersen *et al.*, 2007), *KCNQ2* und *KCNQ3* (Ekberg *et al.*, 2007) wichtige Interaktion mit der *Nedd4-2* Ubiquitin Ligase beschrieben. Diese verringert die Stromamplituden von *KCNQ1/KCNE1*-, *KCNQ2/KCNQ3*- und *KCNQ3/KCNQ5*-Kanälen.

KCNQ2 und *KCNQ3* enthalten im Gegensatz zu allen anderen KCNQ-Mitgliedern in der CTR eine Wechselwirkungsdomäne für *Ankyrin-G* (Pan *et al.*, 2006). Dieses Protein ist Teil des Zytoskeletts und für die Lokalisation der beiden α -Untereinheiten an den Axoninitialsegmenten nötig (Pan *et al.*, 2006). Cooper *et al.* (2000) konnten bereits eine Assoziation von *KCNQ2* mit *KCNQ3*, mit der Proteinkinase A sowie Tubulin nachweisen. Durch diese Wechselwirkungen ergibt sich also ein Anschluss der CTR von *KCNQ2* und *KCNQ3* an das Zytoskelett.

Es ist nicht auszuschließen, dass die Interaktionen zwischen den CTR der KCNQ-Kanäle und regulatorischen Proteinen noch nicht vollständig beschrieben sind. Diese stellen aber mit Sicherheit eine Möglichkeit zur spezifischen Modulation der verschiedenen KCNQ-Mitglieder dar.

1.3.2 Assemblierung der α -Untereinheiten

Für die Assemblierung von Untereinheiten zu einem funktionellen Kanal ist deren gegenseitige Erkennung und Interaktion notwendig. Die effektive Interaktion der α -Untereinheiten wird in vielen Fällen durch eine zytoplasmatische Tetramerisierungsdomäne (T-Domäne) vermittelt, die sich innerhalb der aminoterminalen Region (NTR) befindet (Li *et al.*, 1992). Pfaffinger & DeRubeis (1995) konnten dies für die T1-Domäne des gut untersuchten *Shaker*-Kanals zeigen.

Einige Kv-Kanäle bilden trotz Deletion dieser T-Domäne funktionelle Kanäle, was auf weitere, für die Wechselwirkung relevante Bereiche hinweist (VanDongen *et al.*, 1990; Attali *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994; Tu *et al.*, 1995). T1-Domänen sind für Kaliumkanäle der Kv1

(*Shaker*)-, der Kv2 (*Shab*)-, Kv3 (*Shaw*)- und Kv4 (*Shal*)-Familie beschrieben worden (Covarrubias et al., 2008). Bei den KCNQ-Kanälen (Kv7) konnten bisher keine Tetramerisierungsdomänen in der NTR identifiziert werden.

Einen Einblick in die Assemblierung der KCNQ-Kanäle ermöglicht eine bekannte Mutation von *KCNQ2* beim Menschen, bei der die Insertion von fünf Basenpaaren zum Verlust von etwa 300 Aminosäuren der CTR führt. Dieser Gendefekt ist mit BFNC (*benign familial neonatal convulsions*) assoziiert und entsprechende Kanäle erzeugen in *Xenopus* Oozyten keine Ströme mehr (Biervert et al., 1998). BFNC kann, wie bereits erläutert (Kap. 1.2.3), auch durch Defekte in *KCNQ3* verursacht werden. *KCNQ2* und *KCNQ3* werden im Gehirn koexprimiert (Schroeder et al., 1998) und konnten auch koimmunopräzipitiert werden (Cooper et al., 2000). Zur Ausbildung dieser Heteromeren ist die vollständige CTR von *KCNQ2* notwendig (Schwake et al., 2000). Diese Arbeiten deuteten auf eine wichtige Rolle der CTR der KCNQ-Kanäle bei der Bildung von heteromeren *KCNQ2/KCNQ3*-Kanälen hin.

In weiteren Versuchen wurden chimäre KCNQ-Kanäle hergestellt, in denen bestimmte Sequenzabschnitte der CTR zwischen *KCNQ1* und *KCNQ3* ausgetauscht wurden (Schwake et al., 2003). Dadurch konnten die breiten Heteromerisierungseigenschaften der α -Untereinheit von *KCNQ3* auf *KCNQ1* übertragen werden. Dabei wurde ausgenutzt, dass *KCNQ1* nur Homomere bilden kann und nicht in der Lage ist, mit *KCNQ2* Heteromere auszubilden. Elektrophysiologische und biochemische Experimente identifizierten eine Domäne, die für die spezifische Interaktion und Assemblierung der KCNQ-Untereinheiten notwendig ist. Die Übertragung dieses bestimmten Bereiches, der *subunit interaction*-Domäne (*si*-Domäne) von *KCNQ3* auf *KCNQ1* führte dazu, dass diese Chimäre in der Lage war, mit *KCNQ2* Heteromere auszubilden. Außerdem konnte die Interaktion dieser beiden Proteine mittels Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden (Schwake et al., 2003). Ein vergleichbarer Versuchsansatz durch Maljevic et al. (2003) unterstützt diese Ergebnisse.

Parallel zu diesen Arbeiten wiesen Jenke et al. (2003) auf die Existenz einer zur Tetramerisierung fähigen *coiled-coil* (TCC)-Sequenz im Bereich der CTR von spannungsabhängigen Kaliumkanälen der *eag*-Familie hin. Sequenzvergleiche mit den CTR der KCNQ-Kanäle machten deutlich, dass sich zwei dieser sogenannten TCC-Domänen genau innerhalb der *si*-Domäne befinden (Jenke et al., 2003; Schwake et al., 2003). Die Struktur der *si*-Domäne mit den beiden darin enthaltenen, potenziellen Oligomerisierungsdomänen unterstützt dabei die Annahme, dass die CTR der KCNQ-Kanäle bei der Bildung von heteromeren *KCNQ2/KCNQ3*-Kanälen von Bedeutung sind.

Coiled-coil Domänen werden auch für andere Ionenkanäle vorhergesagt, so für die von zyklischen Nukleotiden gesteuerten Kationenkanälen der CNG-Familie (Kaupp, 1991; Jenke *et al.*, 2003). Wie bei den KCNQ-Kanälen ist auch bei den Kalzium-gesteuerten SK-Kaliumkanälen (Kohler *et al.*, 1996) und den Kationenkanälen TRP2 und TRPC7 (Clapham *et al.*, 2001) das *coiled-coil* Motiv zweigeteilt (Jenke *et al.*, 2003).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der in der NTR gelegenen T1-Domäne und einer *coiled-coil* in der CTR als Tetramerisierungsdomäne besteht in ihrem Synthesezeitpunkt. Die T1-Domäne faltet sich bereits im Endoplasmatischen Retikulum (ER) unmittelbar nach Verlassen des Ribosoms, noch bevor das vollständige Protein translatiert ist (Kosolapov *et al.*, 2003 und 2004). Dabei ist noch Gegenstand der Forschung, ob die Ausbildung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur sukzessiv oder synchron ablaufen und in wieweit sich diese gegenseitig bedingen. Die Faltung der *si*-Domänen kann, bedingt durch ihre Lage in der CTR, erst nach der Translation aller Transmembranregionen S1 bis S6 erfolgen.

Darüber hinaus stellt die *si*- und die T1-Domäne vermutlich nicht nur eine Assemblierungsdomäne dar. So verhindert die T1-Domäne von *Shaker* auch die Heteromerisierung mit nicht-kompatiblen Untereinheiten anderer Kaliumkanäle (Papazian, 1999). Ebenso erfolgt auch die Heteromerisierung von K_v1 -Kanälen mit ihren β -Untereinheiten an der T1-Domäne (Gulbis *et al.*, 2000). Dabei finden die Tetramerisierung der α -Untereinheiten und deren Interaktion mit den β -Untereinheiten bereits im ER statt (Nagaya & Papazian 1997). Auch für *KCNQ1* ergibt sich eine Bedeutung der *si*-Domäne über die Assemblierung hinaus. Marx *et al.* (2002) konnten zeigen, dass in dieser Region das Zielsteuerungsprotein *Yotiao* bindet.

1.3.3 Die *si*-Domäne

Durch die Beschreibung der *si*-Domäne als Teil der CTR der KCNQ-Kanäle durch mehrere Arbeitsgruppen haben sich verschiedene Terminologien ergeben. Abb. 1.7 gleicht die Beschreibung als *si*-Domäne bzw. als A-Domäne (*assembly*) miteinander ab. Wie bereits in Abb. 1.6 gezeigt, werden für die CTR der KCNQ-Mitglieder vier Helices beschrieben. Dadurch wird TCC1-Domäne in der Literatur auch als Helix C bzw. der TCC2-Bereich auch als Helix D bezeichnet. In dieser Arbeit wurden die TCC1-Domäne und die *head*-Domäne, sowie die TCC2-Domäne und die *tail*-Domäne gleichgesetzt, zumal die genaue Abgrenzung der einzelnen Bereiche in den unterschiedlichen Arbeiten leicht variiert.

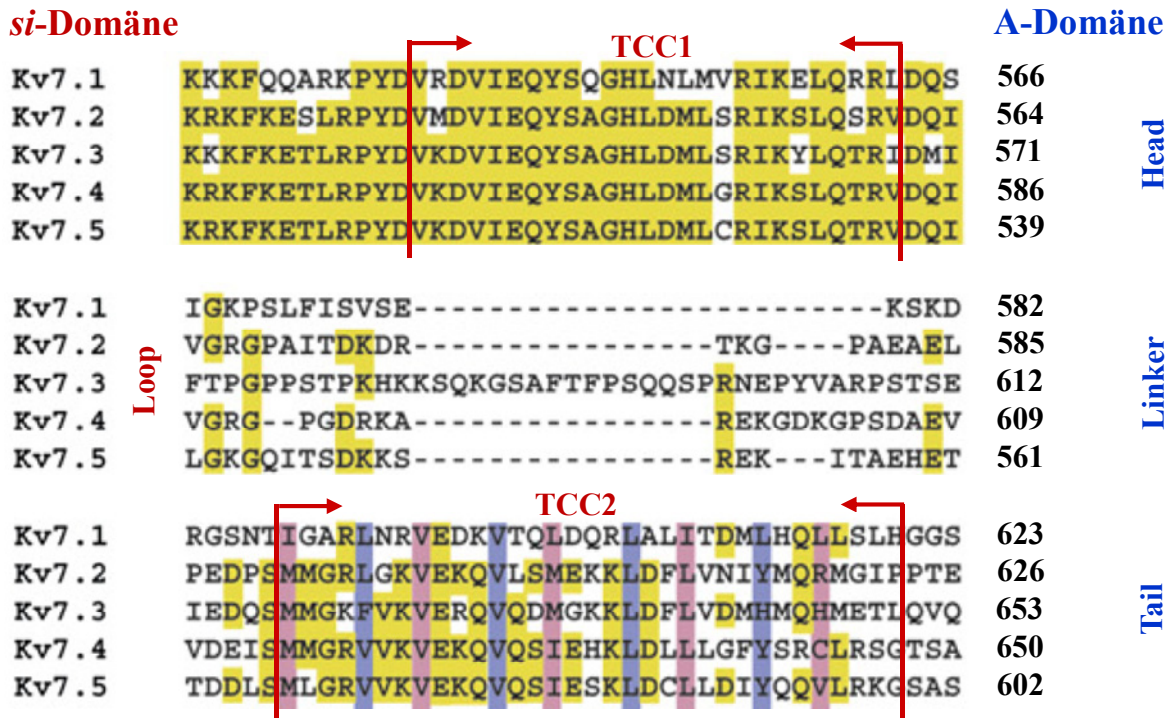


Abb. 1.7: Unterschiedliche Terminologien der si-Domäne

Die Begriffe der Beschreibung als si-Domäne sind rot, die als A-Domäne blau dargestellt. Die Nummerierung wurde den in dieser Arbeit verwendeten Proteinsequenzen (vgl. Anhang I) angepasst. Konservierte Aminosäurepositionen sind gelb hinterlegt. (Abb. modifiziert nach Howard *et al.*, 2007.)

1.3.4 Struktur der coiled-coil Domänen

Die erste *coiled-coil* Struktur wurde von Crick (1952, 1953) für α -Keratin beschrieben. Dabei liegt dieser Quartärstruktur ein einfaches Motiv in der Primärsequenz von α -Helices zugrunde. Es handelt sich um sieben aufeinanderfolgende Aminosäuren, welche eine sogenannte Heptad-Wiederholung $(abcdefg)_n$ ausbilden.

Dabei sind die a- und d-Positionen bevorzugt von hydrophoben Aminosäuren besetzt (Abb. 1.8 A) (Lupas, 1996 a und b). An den e- und g-Positionen sind häufig polare oder geladene Seitenketten zu finden (Grigoryan & Keating, 2008). Da 3,6 Aminosäuren zur Ausbildung einer Windung einer α -Helix benötigt werden (Löffler & Petrides, 2003) ergibt sich dadurch entlang der Längsachse ein leicht gewundener hydrophober Streifen (Abb. 1.8 A). Aufgrund energetischer Wechselwirkungen bildet er in wässrigen Lösungen bevorzugt Interaktionen aus. Daraus ergibt sich, dass nicht alle α -Helices ein *coiled-coil* ausbilden, aber alle *coiled-coil* aus α -Helices bestehen (Abb. 1.8 B).

Per Definition ist ein *coiled-coil* ein Oligomer, welches aus mehreren rechtsgängigen amphipathischen α -Helices besteht. Diese winden sich umeinander zu einer sogenannten Superhelix- oder auch Supercoil-Struktur. Dabei stehen die hydrophoben Regionen auf der Oberfläche der einzelnen Helices in engem Kontakt. Es entsteht eine Struktur, die nach außen hydrophil ist und im Inneren einen hydrophoben Kern hat.

Dieser wiederum besteht aus verschiedenen Ebenen in der die entsprechenden hydrophoben Aminosäuren angeordnet sind (Abb. 1.8 C) und eine sogenannte Knopf-in-Loch Packung (*knobs into hole*) aufweisen (Lupas & Gruber, 2005). Dies bedeutet, dass in einem parallelen Tetramer die räumliche Ausrichtung der Aminosäureseitenketten der hydrophoben Ebenen alterniert, wobei die C β -Atome der d-Ebenen in die Mitte der *coiled-coil* zeigen, die der a-Ebenen aber eher zwischen zwei benachbarten Helices liegen (Abb. 1.8 D).

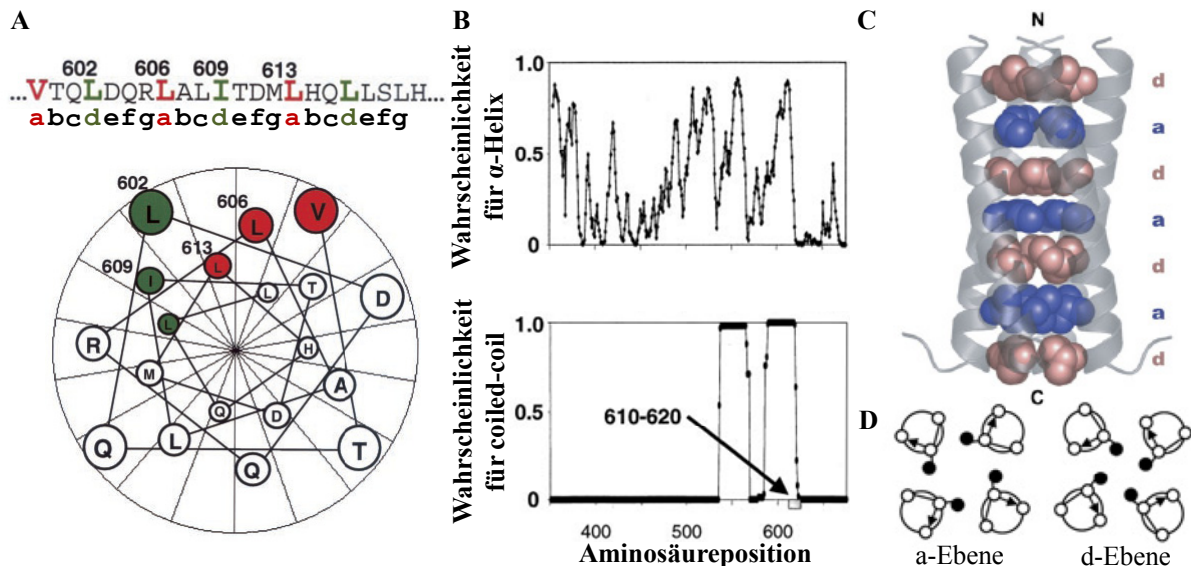


Abb. 1.8 Charakteristika der *coiled-coil* Domänen

(A) *Coiled-coil* Aminosäuremotiv (oben) und Strukturmodell (unten) der α -Helix des zweiten *coiled-coil* Bereichs von *KCNQ1*. Der Blick erfolgt vom N-Terminus auf den C-Terminus. Die a-Positionen sind in rot, die d-Positionen grün wiedergegeben. Die hydrophoben Aminosäureseitenketten bilden einen hydrophoben Streifen entlang der Längsachse aus. (B) Strukturvorhersage für α -Helices (oben) und *coiled-coil* Domänen (unten) für die CTR von *KCNQ1*. Im direkten Vergleich zeigt sich, dass nur zwei Bereiche, für die α -Helices vorhergesagt werden, ebenfalls *coiled-coil* Domänen sein könnten. (C) Seitenansicht einer *coiled-coil* Domäne, in diesem Falle des TCC2-Bereichs von *KCNQ4*, bestehend aus vier α -Helices. Die hydrophoben a-Ebenen sind blau, die d-Ebenen rot wiedergegeben. (D) Unterschiedliche Orientierung der Aminosäureseitenketten in den hydrophoben a- und d-Ebenen. Die Pfeile geben die Richtung der Proteinrückgrades vom N- zum C-Terminus an. Die unausgefüllten Kreise stellen C α -Atome, die schwarzen C β -Atome dar. (Abb. A und B modifiziert nach Kanki *et al.*, 2004; Abb. C und D aus Howard *et al.*, 2007.)

1.3.5 Vorkommen und Bedeutung der *coiled-coil* Domänen

Es sind homomere und heteromere *coiled-coil* Domänen bekannt, deren α -Helices parallel oder anti-parallel angeordnet sein können und aus einer unterschiedlichen Anzahl von Untereinheiten bestehen können (Lupas & Gruber, 2005). Bisher sind eine große Anzahl an Dimeren, Trimeren, Tetrameren und Pentameren beschrieben worden (Grigoryan & Keating, 2008). Außerdem ist genau ein paralleles Bündel aus sieben α -Helices in einer *coiled-coil* Domäne bekannt (Liu *et al.*, 2006). Hexamere Bündel sind bisher nicht beschrieben worden. Diese Diversität ermöglicht, dass eine *coiled-coil* Domäne an Wechselwirkungen mit mehreren Proteinen beteiligt sein kann, wobei die Interaktionen dabei auch als dynamisches Gleichgewicht auftreten können (Portwich *et al.*, 2007).

Coiled-coil Domänen wurden seit der Beschreibung durch Crick (1952, 1953) in unterschiedlichsten Proteinen gefunden und werden für etwa 10 % aller Proteine in Eukaryoten vorhergesagt (Liu & Rost, 2001). Besonders in der Gruppe der Filamente sind zahlreiche Vertreter beschrieben, zu denen auch α -Keratin gehört, welche aufgrund langgestreckter *coiled-coil* Domänen die kabelartigen Strukturen des Zytoskeletts ausbilden (Rose & Meier, 2004).

Auch die Funktionalität der Leucin-Zipper, unter anderem als Transkriptionsfaktoren von Bedeutung, wird von dimeren *coiled-coil* Domänen bestimmt (Alber, 1992; Glover & Harrison, 1995). Naik *et al.* (2001) konnten im Falle des *TlpA* nachweisen, dass dieses die Genexpression temperaturabhängig regulieren kann. Bei der systematischen Untersuchung von synthetischen Peptiden konnte auch gezeigt werden, dass die Ausbildung von *coiled-coil* Domänen pH- oder salzabhängig erfolgen kann (Yu, 2002). *Coiled-coil* Domänen eignen sich daher aufgrund ihrer Struktur gut zur Ausbildung von Interaktionen.

1.4 Fragestellung

Die unterschiedliche Expression und die korrekte Assemblierung der Untereinheiten in den verschiedenen Geweben ermöglicht die Ausbildung funktioneller, tetramerer KCNQ-Kanäle mit charakteristischen Eigenschaften. An der Spezifität der Interaktion ist offenbar die *si*-Domäne wesentlich beteiligt.

- Zunächst sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob die isolierte *si*-Domäne als Tetramer vorliegt und somit die Tetramerisierungsdomäne der KCNQ-Kanäle darstellt.
- Dabei sollte insbesondere der Einfluss der beiden in diesem Bereich vorhergesagten *coiled-coil* Domänen (TCC-Domänen) auf die Assemblierung aufgeklärt werden. In diesem Zusammenhang sollte auch untersucht werden, ob zwischen dem ersten und dem zweiten TCC-Bereich eine Wechselwirkung besteht.
- Da die *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromeren von besonderer physiologischer Bedeutung sind, sollte auch eine mögliche Heteromerisierung ihrer *si*-Domänen untersucht werden.
- Letztendlich sollte die vollständige Strukturaufklärung der *si*-Domäne mittels Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie erfolgen.

Durch die Untersuchungen sollte das Verständnis für beschriebene Mutationen der *si*-Domäne und deren Auswirkungen auf die untereinheitenspezifische Interaktion verbessert werden.

2 Material und Methoden

Die gentechnischen Experimente der Sicherheitsstufe 1 (S1/B1) wurden gemäß den Richtlinien des Gentechnikgesetzes (GenTG) und der Gentechniksicherheits-Verordnung (GenTSV) in ihren aktuellen Fassungen durchgeführt.

Molekularbiologische Methoden wurden, wenn nicht anders erwähnt, nach den Standardprotokollen von Sambrook & Russell (2000) durchgeführt.

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarosegel-Elektrophoresekammer	(Mini) Sub-Cell GT	BioRad, München
Analysewaage	Modell 770-60	Kern & Sohn, Dürrewangen
Binokular	KL 200	Zeiss, Jena
Chemilumineszenz-Anlage	LAS-3000 mini	Fujifilm, Carrollton, USA
CD-Spektrometer	J-720 Spectropolarimeter	Jasco, Gross-Umstadt
CD-Küvetten	Quarzglas, verschiedene Schichtdicken	Hellma Optik, Jena
CD-Thermoelement	PTC-423S	Jasco, Gross-Umstadt
Corex-Röhrchen	30 ml	DuPont Instruments, Wilmington, USA
Elektroporationsgerät	Gene Pulser	BioRad, München
Elektroporationsküvetten	25 x 2 mm	PeqLab, Erlangen
Gradientenformer		Eigenbau
Größenausschlusschromatographie (SEC)-Säulen	Superdex Peptide 10/300 GL HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade (3 Exemplare, vergleiche Anhang II) HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA
Größenausschlusschromatographie (SEC)-Anlage	ÄKTA explorer	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Heizlüfter	GelAir Dryer	BioRad, München
Homogenisator	Precellys 24	PeqLab, Erlangen
Horizontal-Mikropipetten-Ziehgerät für Oozyten	DMZ-Universal Puller	Zeitz-Instrumente, Augsburg
Horizontalschüttler	KL2	Bühler, Hechingen
Inkubator für Bakterien	Modell 200, Orbital Incubator	Memmert, Schwabach Gallenkamp, Loughborough, UK
Inkubator für Hefen	WTB	Binder, Tuttlingen
Inkubator für Oozyten	Multitron II	Infors, Bottmingen, CH
Mikropipetten-Injektionsgerät	KB 53	Binder, Tuttlingen
	Nanoliter 2000	WPI, Sarasota, USA

PCR-Gerät	GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, USA
pH-Elektrode	Digital-pH-Meter 646	Krick, Langenselbold
Photometer	GeneQuant pro, Nanodrop ND-1000	Biochrom, Cambridge, UK PeqLab, Erlangen
Rollkippschüttler	RM 5 Assistent	Karl Hecht, Sondheim
SDS-PAGE- Elektrophoresekammer	Mini-Protean 3, XCell SureLock	BioRad, München Invitrogen, Carlsbad, USA
SDS-PAGE-Trockner	GelAir Dryer	BioRad, München
Spannungsgeber	PowerPac 200/300	BioRad, München
Tank-Blot-Apparatur	Criterion blotter	BioRad, München
Ultraschall-Stab	Micro Ultrasonic Cell Disrupter KT-50	Kimble/Kontes, Vineland, USA
UV-Dokumentationsanlage	Gel Jet Imager	Intas, Göttingen
Verstärker	TurboTec-05X	npi Electronic, Tamm
Zentrifugen	Fresco 21, Multifuge 3SR+, Multifuge 2, J6-HC, J2-HS,	Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau Heraeus Christ, Osterode Beckman, München Beckman, München

Tab. 2.1: Geräte

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Blot-Papier	Whatman	Roth, Karlsruhe
Cellophan-Folie	Cellophan Support	BioRad, München
Dialyseschlauch	ZelluTrans 4-6 kDa MWCO	Roth, Karlsruhe
DNA-Standardmarker	1 kb-DNA-Leiter	Roche, Mannheim
Glaskapillare für Oozyten-Injektion	4878 für Nanoliter 2000	WPI, Sarasota, USA
Glaskapillare für Oozyten-Punktion	GB 150F-8P mit Filament	WPI, Sarasota, USA
Glasperlen	425-600 µm	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nickel-Affinitätsgel	Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Parafilm	Größe M	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Plastik-Einmalpipetten	5 ml, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Protein-Standardmarker	Page Ruler protein ladder (prestained und unstained), PrecisionPlus Protein Standards,	Fermentas, St. Leon-Rot BioRad, München
PVDF-Membran	Millipore, Immobilon P	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße	verschiedene Größen	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubdeckelröhrchen	verschiedene Größen	Sarstedt, Nümbrecht
SDS-PAGE Gradientengel	NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gradientengele 1,5 mm, 10 well	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sterilfilter	Filtropur S, 0,2 µM	Sarstedt, Nümbrecht
Ultrafiltrationseinheiten	Vivaspin 2 und Vivaspin 20, 3000 MWCO PES	Vivascience, Stonehouse, UK
96-Well-Mikrotiterplatten	Rundboden	Sarstedt, Nümbrecht

Tab. 2.2: Verbrauchsmaterial

2.1.3 Kits

cRNA-Synthese	mMessage mMachine SP6 Kit	Ambion, Austin, USA
DNA-Aufreinigung	High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim
Größenausschluss- chromatographie (SEC) Standards	Gel Filtration Low Molecular Weight (LMW) Calibration Kit	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
	Gel Filtration High Molecular Weight (HMW) Calibration Kit	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
	Gel Filtration Calibration Kits LMW	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Hefe-Split-Ubiquitin- System	DUALmembrane Kit I	Dualsystems Biotech, Schlieren, CH
	Yeast-Two-Hybrid Membrane Protein Kit	MoBiTec, Göttingen
Plasmid-Isolierung	peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	PeqLab, Erlangen
	GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
	PureYield Plasmid Midiprep System	Promega, Mannheim
Western-Blot Detektion	ECL Plus Western Blotting Detection System	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
	ECL Advanced Western Blotting Detection System	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK

Tab. 2.3: Kits

Die Handhabung der Kits entsprach den Angaben der Hersteller.

Es wurden die mitgelieferten Puffer verwendet.

2.1.4 Proteine und Standards

Blue Dextran	2.000.000 Da	HMW Calibration Kit, Amersham Biosciences
Aldolase	177.000 Da	HMW Calibration Kit, Amersham Biosciences
Albumin	67.400 Da	LMW Calibration Kit, Amersham Biosciences
Ovalbumin	49.100 Da	LMW Calibration Kit, Amersham Biosciences
Carboanhydrase	29.000 Da	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chymotrypsinogen A	20.400 Da	LMW Calibration Kit, Amersham Biosciences
Myoglobin	17.600 Da	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ribonuklease A	15.600 Da	LMW Calibration Kit, Amersham Biosciences
Cytochrom c	12.400 Da	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aprotinin	6.500 Da	Roth, Karlsruhe
Vitamin B ₁₂	1.355 Da	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tab. 2.4: Proteine und Standards

2.1.5 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Rotiphorese Gel 30, Verhältnis 37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Rotiphorese Gel 40, Verhältnis 29:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Agarose (niedriger Schmelzpunkt)	Sigma-Aldrich, Steinheim
CAPS (3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Complete Protease-Inhibitor Cocktail Tabletten (mit und ohne EDTA)	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G-250	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R-250	Roth, Karlsruhe
dNTPs (2 mM je Nukleotid)	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethidiumbromid-Lösung (1%)	Roth, Karlsruhe
Glycerin (99,9%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Guanidin-hydrochlorid (Gu HCl)	Roche, Mannheim
Guanidin-hydrochlorid (Gu HCl), technisch	Degussa, Essen
Hefe-Stickstoff-Base ohne Aminosäuren	Becton Dickinson, Heidelberg
IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid)	Fermentas, St. Leon-Rot
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Sulfo-EGS	Pierce / Perbio Science, Bonn
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -galaktopyranosid)	Roth, Karlsruhe

Tab. 2.5: Chemikalien

Alle übrigen Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen MERCK (Darmstadt), ROCHE (Mannheim), ROTH (Karlsruhe), SERVA (Heidelberg) und SIGMA-ALDRICH (Steinheim) bezogen. Der Reinheitsgrad der Chemikalien war „Pro analysi, p.a.“.

2.1.6 Puffer und Lösungen

5 x Ladepuffer für Agarosegele	30 % Glycerin 40 % Saccharose 50 mM EDTA pH 8,0 0,001 % Bromphenolblau ad 100 % dH ₂ O
50 x TAE-Puffer	2 M Tris 2 M Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1000 ml dH ₂ O
5 x Ladepuffer für SDS-PAGE, reduzierend	0,6 ml dH ₂ O 1,0 ml 0,5 M Tris pH 6,8 4,0 ml Glycerin 1,6 ml 1 % SDS 0,4 ml β -Mercaptoethanol 0,4 ml 1 % Bromphenolblau (w/v)

Material und Methoden

SDS-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris 0,4 % SDS pH 6,8
SDS-Trenngelpuffer	1,5 M Tris 0,4 % SDS pH 8,8
10 x SDS-Elektrodenpuffer	1,92 M Glycerin 250 mM Tris 35 mM SDS ad 1000 ml dH ₂ O
1 x MOPS-Puffer	10,46 g MOPS 6,06 g Tris 1,0 g SDS 0,3 g EDTA pH 7,7 (nicht einstellen)
Coomassie-Färbelösung	500 ml Methanol 115 ml 60 % Essigsäure 385 ml dH ₂ O 1,8 g Coomassie Brilliant Blue über Nacht rühren, durch Faltenfilter filtrieren
Coomassie-Entfärbelösung	100 ml Eisessig 100 ml Isopropanol 800 ml dH ₂ O
10 x Tank-Blot-Puffer	29 g Glycin 58 g Tris 3,7 g SDS ad 1000 ml dH ₂ O pH 8,3-pH 8,8 (nicht einstellen)
1 x Tank-Blot-Puffer	100 ml 10 x Tank-Blot-Puffer 200 ml Methanol 700 ml dH ₂ O
Western-Blot Blockierlösung	5 % Magermilchpulver in TBS-Tween
10 x TBS	150 mM NaCl 25 mM Tris pH 7,4
TBS-Tween	1 ml Tween-20 ad 1000 ml 1 x TBS

Material und Methoden

Ponceau-S-Lösung	0,1 % Ponceau S 5 % Essigsäure in dH ₂ O
5 x Blue-Native Ladepuffer	100 mM Tris 40 % Glycerin 0,5 % Coomassie Brilliant Blue G-250 pH 8,0
Blue-Native Gelpuffer	200 mM Tris pH 8,8
Blue-Native Anodenpuffer	100 mM Tris pH 8,8
Blue-Native Kathodenpuffer	100 mM Histidin (0,002 % Coomassie Brilliant Blue G-250) pH 8,0 (mit Tris-Base statt HCl einstellen)
1 x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
Lysispuffer für Bakterien	20 mM HEPES 500 mM NaCl 2,5 mM MgCl ₂ 0,1 mM CaCl ₂ pH 7,4
DNase / RNase-Puffer	50 mM Tris 10 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ ad 100 ml dH ₂ O Complete Protease-Inhibitor ohne EDTA pH 7,5
Waschpuffer I für Einschlusskörper	50 mM Tris 2 M NaCl 0,1% Tween-20 pH 7,4
Waschpuffer II für Einschlusskörper	50 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,4
Waschpuffer für Ni-NTA-Agarose	6 M Gu HCl 20 mM Imidazol 50 mM Tris pH 8

Elutionspuffer für Ni-NTA-Agarose	6 M Gu HCl 250 mM Imidazol 50 mM Tris pH 8
CAPS-Puffer	50 mM CAPS pH 11 oder 12 (mit konzentrierter NaOH eingestellt)
Natriumacetat-Puffer	50 mM CH ₃ COONa pH 5
DEPC-H ₂ O	0,1 % DEPC über Nacht rühren, anschließend autoklavieren
OR-2-Lösung	5 mM HEPES 82,5 mM NaCl 2 mM KCl 1 mM MgCl ₂ pH 7,5
ND96-Lösung	5 mM HEPES 96 mM NaCl 2 mM KCl 1,8 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ pH 7,5

Alle Lösungen und Medien wurden mit deionisiertem Wasser (dH₂O) angesetzt. Bei Lösungen für die RNA-Herstellung wurde DEPC-behandeltes Wasser verwendet, außerdem wurden sterile Geräte und Behältnisse benutzt. Die Sterilisation von Puffern und Gegenständen erfolgte in einem Autoklaven für 20 Minuten bei 121°C und 1 bar Überdruck. Hitzeempfindliche Chemikalien wurden steril filtriert.

2.1.7 Medien

LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1000 ml dH ₂ O pH 7,0
LB-Agar	15 g Agar-Agar ad 1000 ml LB-Medium

Alle Nährmedien wurden durch Autoklavieren sterilisiert. Die zur Selektion nötigen Antibiotika und andere hitzeempfindliche Chemikalien wurden anschließend steril hinzugegeben.

2.1.8 Organismen

2.1.8.1 *E. coli*

XL1-Blue (Novagen, USA):

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' *proAB lacI^qΔM15 Tn10* (Tet^r)]

Dieser Stamm ist eine Variante des Sicherheitsstammes K12 und diente zur Klonierung und Gewinnung von Plasmid-DNA, da er rekombinationsdefizient ist (Bullock *et al.*, 1987).

Rosetta (Novagen, Madison, USA):

F⁻ *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm pRARE* (Cam^r)

Dieser Stamm diente der Expression von Proteinen. Er enthält das Plasmid pRARE. Dieses kodiert für die tRNAs der Kodons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC und GGA, die in Bakterien selten, aber in humaner Sequenz häufiger vorkommen. Durch das zusätzliche Plasmid soll ein Abbruch der Translation aufgrund eines tRNA-Mangels verhindert werden.

2.1.8.2 Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

DSY-1 (DUALmembrane Kit, Dualsystems Biotech, Schlieren, CH):

MATa *his3Δ200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 LYS2::(lexAop)4-HIS3 URA3::(lexAop)8-lacZ GAL4*

Dieser Stamm der Bäckerhefe diente der Expression von Proteinen. Die Histidin-Defizienz ermöglichte dabei die Untersuchung möglicher Interaktion von koexprimierten Proteinen im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid*-System.

2.1.8.3 Krallenfrosch (*Xenopus laevis*)

Die 10 bis 13 Zentimeter großen und 80 bis 100 g schweren Weibchen wurden im Tierhaus der Universität gehalten.

2.1.9 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) synthetisiert. Sie wurden zu einer Konzentration von 100 pmol / μl in sterilem Wasser gelöst und bei -20°C gelagert. Eine vollständige Liste der verwendeten Primer befindet sich im Anhang III.

2.1.10 Vektoren und Plasmide

2.1.10.1 Verwendung in Bakterien

pET30a-Vektor (Novagen, Madison, USA):

Dieses Kanamycin-Resistenz vermittelnde Plasmid wurde zur Expression von Proteinen in *E. coli* verwendet. Bei Verwendung der *KpnI*- und *XhoI*- Schnittstellen entsteht ein N-terminal markiertes Protein. Die Markierung umfasst eine His₆-Sequenz, eine Thrombin-Schnittstelle, ein S-Tag und eine Enterokinase-Schnittstelle. Eine optionale C-terminale His₆-Markierung wurde durch die Einführung eines Stop-Kodons in den verwendeten Oligonukleotiden nicht genutzt. Das Plasmid steht unter der Kontrolle des T7 Promotors. Die Transkription lässt sich durch IPTG induzieren. Bei Verwendung der *NdeI*- und *XhoI*-Schnittstelle entstehen unmarkierte Proteine.

pMA-Vektor (Geneart, Regensburg):

Dieser Vektor wurde von der Firma Geneart (Regensburg) verwendet, um die kodon-optimierte, unmarkierte Sequenz der *si*-Domäne von *KCNQ3* herzustellen. Es vermittelt eine Ampicillin-Resistenz.

Plasmid	Kodiertes Protein
Q2oTpET30	<i>sid</i> von <i>KCNQ2</i> , ohne Markierung
Q2pET30	<i>sid</i> von <i>KCNQ2</i> , unter anderem His ₆ -Markierung am N-Terminus
Q2-TCC1 _{LzuP} ¹	wie Q2pET30, aber L557P
Q2-TCC2 _{LzuP} ¹	wie Q2pET30, aber L609P
Q2-TCC1+2 _{LzuP} ¹	wie Q2pET30, aber L557/609P
Q2pET30-CHis	<i>sid</i> von <i>KCNQ2</i> , His ₆ -Markierung am C-Terminus
Q2-TCC1 _{LzuP} -CHis	wie Q2pET30-CHis, aber L557P
Q2-TCC2 _{LzuP} -CHis	wie Q2pET30-CHis, aber L609P
Q2-TCC1+2 _{LzuP} -CHis	wie Q2pET30-CHis, aber L557/609P
Q3oTpMA ²	Kodon-optimierte <i>sid</i> von <i>KCNQ3</i> ohne Markierung
Q3oTpET30	<i>sid</i> von <i>KCNQ3</i> , ohne Markierung
Q3pET30	<i>sid</i> von <i>KCNQ3</i> , unter anderem His ₆ -Markierung am N-Terminus
Q3-TCC1 _{LzuP}	wie Q3pET30, aber L564P
Q3-TCC2 _{LzuP}	wie Q3pET30, aber L636P
Q3-TCC1+2 _{LzuP}	wie Q3pET30, aber L564/636P
Q3pET30-HA	<i>sid</i> von <i>KCNQ3</i> , unter anderem HA-Markierung am N-Terminus
Q2 Cal <i>sid</i> oT	<i>KCNQ2</i> ab CaM Bindestelle bis einschließlich <i>sid</i> ohne Markierungen
Q2 Cal <i>sid</i> CHis	<i>KCNQ2</i> ab CaM Bindestelle bis einschließlich <i>sid</i> mit His ₆ -Markierung am C-Terminus
Q3 Cal <i>sid</i> oT	<i>KCNQ3</i> ab CaM Bindestelle bis einschließlich <i>sid</i> ohne Markierungen
Q3 Cal <i>sid</i> CHis	<i>KCNQ3</i> ab CaM Bindestelle bis einschließlich <i>sid</i> mit His ₆ -Markierung am C-Terminus

Tab. 2.6: Vektoren und Plasmide für Bakterien

Bis auf Q3oTpMA handelt es sich bei allen Plasmiden um Derivate des pET30a-Vektors.

Die Konstrukte wurden, wenn nicht anders angegeben, innerhalb dieser Doktorarbeit hergestellt. Einige Plasmide wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von: ¹Christian Beimgraben (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Paul Saftig, Universität Kiel); ²Geneart (Regensburg).

2.1.10.2 Verwendung in Hefen

Plasmid	Vektor	Kodiertes Protein
Q2 bait N	pBT3-N	KCNQ2-CT nach S6 mit LexA/VP16/Cub am NT
Q2 bait C	pBT3-C	KCNQ2-CT nach S6 mit Cub/VP16/LexA am CT
Q2 bait C S5	pBT3-C	KCNQ2-CT ab einschließlich S5 mit Cub/VP16/LexA am CT
Q2 bait C S6	pBT3-C	KCNQ2-CT ab einschließlich S6 mit Cub/VP16/LexA am CT
Q3 prey N	pPR3-N	KCNQ3-CT nach S6 mit NubG/HA am NT
Q3 prey C	pPR3-C	KCNQ3-CT nach S6 mit HA/NubG am CT
pALG-NubI		Alg5 fusioniert mit NubI am NT, dieses <i>prey</i> -Protein dient als Positivkontrolle
pALG-NubG		Alg5 fusioniert mit NubG am NT, dieses <i>prey</i> -Protein dient als Negativkontrolle

Tab. 2.7: Vektoren und Plasmide für Hefen

Alle *bait*-Plasmide vermitteln eine Kanamycin-Resistenz und einen Leucin-Wachstumsmarker. Die *prey*-Plasmide hingegen vermitteln eine Ampicillin-Resistenz und einen Tryptophan-Wachstumsmarker.

2.1.10.3 Verwendung in *Xenopus* Oozyten

pTLN-Vektor (Lorenz *et al.*, 1996):

Plasmide, die auf dem pTLN-Vektor beruhen, wurden zur cRNA-Synthese für die Injektion in *Xenopus* Oozyten verwendet. Der Vektor ist eine Abwandlung des Vektors pSP64T und enthält die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des β -Globingens von *Xenopus laevis*. Diese sollen die Expression in Oozyten steigern. pTLN-Plasmide werden vom SP6-Promotor kontrolliert und vermitteln eine Ampicillinresistenz.

Plasmid	Kodiertes Protein
Q1pTLN ¹	KCNQ1 Wildtyp
Q2pTLN ¹	KCNQ2 Wildtyp
Q3pTLN ¹	KCNQ3 Wildtyp
Q4pTLN ¹	KCNQ4 Wildtyp
Q1del Loop	KCNQ1 ohne Loop zwischen TCC1 und TCC2

Q2 del Loop	KCNQ2 ohne Loop zwischen TCC1 und TCC2
Q3 del Loop	KCNQ3 ohne Loop zwischen TCC1 und TCC2
Q4 del TCC2	KCNQ4 ohne TCC2
pTLN-Q2-TCC1-X ¹	KCNQ2 bis einschließlich TCC1
pTLN- TCC2-CT-Q2 ¹	KCNQ2-CT ab einschließlich TCC2
pTLN- dCT-Q2 ¹	KCNQ2-CT nach TCC2

Tab. 2.8: Vektoren und Plasmide für Oozyten

Die Konstrukte wurden, wenn nicht anders angegeben, innerhalb dieser Doktorarbeit hergestellt. Einige Plasmide wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von: ¹Dr. Michael Schwake (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Paul Saftig, Universität Kiel).

2.1.11 Enzyme

Enzym	EC Nummer	Hersteller
Kälberdarm Alkalische Phosphatase (CIAP)	3.1.3.1	Fermentas, St. Leon-Rot
DNase I	3.1.21.1	Roche, Mannheim
RNase A	3.1.27.5	Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym	3.2.1.17	Sigma-Aldrich (Serva), Steinheim
Reverse Transkriptase (RT)	2.7.7.49	mMessage mMachine SP6 Kit, Ambion
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	2.7.7.7	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	2.7.7.7	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA-Ligase	6.5.1.1	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	3.1.21.4	Fermentas, St. Leon-Rot

Tab. 2.9: Enzyme

Die Handhabung der Enzyme entsprach den Angaben der Hersteller.

Es wurden die mitgelieferten Puffer verwendet.

2.1.12 Peptide

Peptid	Sequenz
Q3-TCC1-Peptid	H-DVKDVIEQYSAGHLDMLSRIKYLQTRIDMIF-OH
Q3-TCC2-Peptid	H-SMMGKFKVERQVQDMGKKLDFLVDMMHMQHMERLQ-OH

Tab. 2.10: Übersicht über die verwendeten Peptide

Die Peptide wurden in lyophilisierter Form von der Firma JPT Peptide Technologies (Berlin) mit mehr als 95 % Reinheit bezogen.

2.1.13 Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Primär-Antikörper			
α -His	Maus	1:1.000	Dianova, Hamburg
α -HA (3F10)	Ratte	1:1.000	Roche, Mannheim
α -LexA	Maus	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
α -KCNQ1 (H-130)	Kaninchen	1:2.000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
α -KCNQ2	Kaninchen	1:2.000	Pineda, Berlin
α -KCNQ3	Schaf (polyklonal)	1:5.000	Pineda, Berlin
α -KCNQ4 (K4C)	Kaninchen	1:2.000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
POD-gekoppelte Sekundär-Antikörper			
α -Maus	Schaf	1:10.000	Dianova, Hamburg
α -Ratte	Kaninchen	1:10.000	Dianova, Hamburg
α -Schaf	Esel	1:10.000	Dianova, Hamburg
α -Kaninchen (H1806)	Esel	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Tab. 2.11: Übersicht über die verwendeten Peptide

2.1.14 Programme und Datenbanken

Als Bezugsquelle für **Protein-Sequenzen** wurde die NCBI Datenbank verwendet (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Eine Auflistung der verwendeten Sequenzen ist in Anhang I.

Sequenzanalysen erfolgten mit dem „BioEdit Sequenz Alignment Editor 7.0.9.0“ (Ibis Biosciences, Carlsbad, USA).

Die Vorhersage der **coiled-coil Wahrscheinlichkeit** wurde mit dem Programm „COILS“ nach Lupas *et al.* (1991) durchgeführt. Das Programm ist unter anderem auf der Internetseite www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html verfügbar. Soweit nicht anders gekennzeichnet, wurden dabei Fenster von jeweils 14 aufeinander folgenden Aminosäuren analysiert.

Zur **Vorhersage der α -helikalen Bereiche** eines Proteins wurde das Programm „Predict Protein“ nach Rost *et al.* (2004) verwendet. Es ist unter www.predictprotein.org zugänglich.

Die **Vorhersage des isoelektrischen Punktes** erfolgte mit Hilfe des auf den Internet-Seiten von „ExpASy“ (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html) verfügbaren Programmes „Compute pI / M_w“ nach Bjellqvist *et al.* (1993, 1994) und Gasteiger *et al.* (2003).

Für die **Vorhersage der Transmembran-Helices** wurde das Programm „TMHMM 2.0“ nach Krogh *et al.* (2001) verwendet, welches unter www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/ verfügbar ist.

Die Berechnung der **Sekundärstrukturanteile aus CD-Spektren** erfolgte nach der Methode von Provencher & Glöckner (1981).

Die **digitale Bildbearbeitung** erfolgte mit „Adobe Photoshop 6.0“ (Adobe Systems, San Jose, USA).

Für die Messung und Auswertung der **Ströme in *Xenopus* Oozyten** wurde die Software „Clamp 9.2“ (Axon Instruments, Molecular Devices Union City, USA) verwendet.

Als Bezugsquelle für **Protein-Strukturen** wurde die PDB-Datenbank (www.pdb.org) verwendet.

Die Generierung von Protein-Modellen mittels **Molecular Modeling** erfolgte mit dem Programm „WHAT IF“ nach Vriend (1990).

Für die **graphische Darstellungen der Molekülstrukturen** wurden die Programme „Ribbons“ nach Carson (1997) und „GRASP“ nach Nicholls *et al.* (1991) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Techniken

2.2.1.1.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur spezifischen Amplifizierung ausgewählter DNA-Abschnitte. Unter der Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden und der Wiederholung bestimmter Temperaturzyklen wird ein Teil einer DNA-Matrize exponentiell vermehrt. Je nach gewünschter Anwendung kann das dafür angewendete Programm modifiziert werden. Die wesentlichen Schritte einer PCR bleiben aber immer erhalten.

Zu Beginn der Reaktion werden durch mehrminütiges Erhitzen des PCR-Ansatzes auf 95°C die Sekundärstrukturen der DNA aufgelöst. Weiteres Erhitzen führt zum Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge (Denaturierung). Während der folgenden Abkühlung können nun sequenzspezifische Oligonukleotide, die als Synthesestartpunkte für die DNA-Polymerase dienen, an die einzelsträngige DNA hybridisieren (*annealing*). Beide sind 5'-3' orientiert, liegen aber auf unterschiedlichen Strängen an entgegengesetzten Enden der zu amplifizierenden Sequenz. Deswegen wird dasjenige in Leserichtung des Gens als *forward* bezeichnet, das andere als *reverse*.

Eine anschließende Temperaturerhöhung auf die optimale Arbeitstemperatur des Enzyms führt zu einer Verlängerung (Elongation) der Oligonukleotide und zur Ausbildung eines Doppelstrangbereiches. Die Elongationsdauer wird dabei der Länge des gewünschten DNA-Fragments und der verwendeten Polymerase angepasst.

Durch zyklische Wiederholung dieser Vorgänge kommt es zur exponentiellen Vermehrung der von den Oligonukleotiden flankierten Sequenz. Nach Abschluss der Temperaturzyklen kann in einer mehrminütigen Phase die Polymerase bisher unvollendete Fragmente vervollständigen. Über die eingesetzten Oligonukleotide lassen sich außerdem Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, sowie Mutationen und Markierungen in das PCR-Produkt einführen. Als DNA-Matrize können alle Arten von DNA wie genomische DNA, Plasmide, PCR-Produkte oder ganze Bakterienkolonien dienen.

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde verändert nach Saiki *et al.* (1988) durchgeführt. Sie wird zu präparativen und analytischen Zwecken verwendet.

2.2.1.1.1.1 *Pfu*-PCR

Die PCR unter der Verwendung der *Pfu*-Polymerase folgt im Wesentlichen der Standardmethode. Dieses Enzym unterscheidet sich aber durch seine Exonukleaseaktivität von anderen Polymerasen, so zum Beispiel von der *Taq*-Polymerase. Diese Eigenschaft ermöglicht, dass ein zuletzt angehängtes Nukleotid bei falscher Basenpaarung wieder vom synthetisierten DNA-Strang hydrolysiert werden kann. Diese Fehlerkorrektur verleiht der *Pfu*-Polymerase eine größere Genauigkeit, allerdings ist dafür die Synthesegeschwindigkeit geringer (etwa 1 kb in 2 Minuten). Die *Pfu*-Polymerase wurde daher in den ersten Schritten einer Klonierung zur Herstellung von möglichst fehlerfreien DNA-Fragmenten genutzt, die zur Ligation verwendet werden sollten.

Die Versuchsdurchführung folgte den Angaben des Enzym-Herstellers (Fermentas) dessen *Pfu*-Reaktionspuffer ebenfalls verwendet wurde.

50 µl Reaktionsansatz:	27,5 µl	dH ₂ O
	5 µl	10 x <i>Pfu</i> -Reaktionspuffer mit MgCl ₂
	5 µl	dNTPs
	2,5µl	DMSO
	2 µl	<i>forward</i> Oligonukleotid (10 µM)
	2 µl	<i>reverse</i> Oligonukleotid (10 µM)
	5 µl	DNA-Matrize (10 ng/µl)
	1 µl	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl)

<i>Pfu</i> -PCR-Programm:	Initiale Denaturierung	94°C	5 Minuten	
	Denaturierung	94°C	1 Minute	} 30 x
	Annealing	55°C	1 Minute	
	Elongation (je nach Produktlänge)	72°C	variabel	
	Abschließende Elongation	72°C	5 Minuten	
	Kühlung	10°C	∞	

2.2.1.1.1.2 Fusions-PCR

Die *Pfu*-PCR kann zur Fusions-PCR abgewandelt werden, um das Einführen von Mutationen oder das Hinzufügen zu bzw. das Entfernen ganzer DNA-Abschnitte aus einer bestehenden Sequenz zu ermöglichen. Zunächst wurden, wie in der bisher beschriebenen Technik, einzelne DNA-Abschnitte vervielfältigt. Um zwei von ihnen miteinander zu einem Abschnitt zu fusionieren, wurden die Produkte zunächst getrennt aufgereinigt (2.2.1.1.4 Gelelution).

Bei der Auswahl der Oligonukleotide für die Fusions-PCR wurde zuvor darauf geachtet, dass sich ein etwa 15 bis 25 bp langer Bereich am Ende der einen Sequenz mit dem Anfang der anzuhängenden Sequenz paaren kann. D.h., die Oligonukleotide enthalten einen kurzen Abschnitt revers komplementärer Sequenzen. Nach der Herstellung der einzelnen DNA-Fragmente (Abb. 2.1 A und B) wurden diese in der eigentlichen Fusions-PCR (Abb. 2.1 C) nur durch Zugabe der die fusionierende Sequenz begrenzenden Oligonukleotide fusioniert und vervielfältigt. Dies ist möglich, weil sich in der Annealing-Phase die einzelsträngige DNA abkühlt, und sich nun auch ein Doppelstrang zwischen den Einzelsträngen zweier unterschiedlicher PCR-Produkte ausbilden kann. In diesem Falle dient der Einzelstrang des einen PCR-Produkts als (wenn auch großes) Oligonukleotid des anderen Stranges.

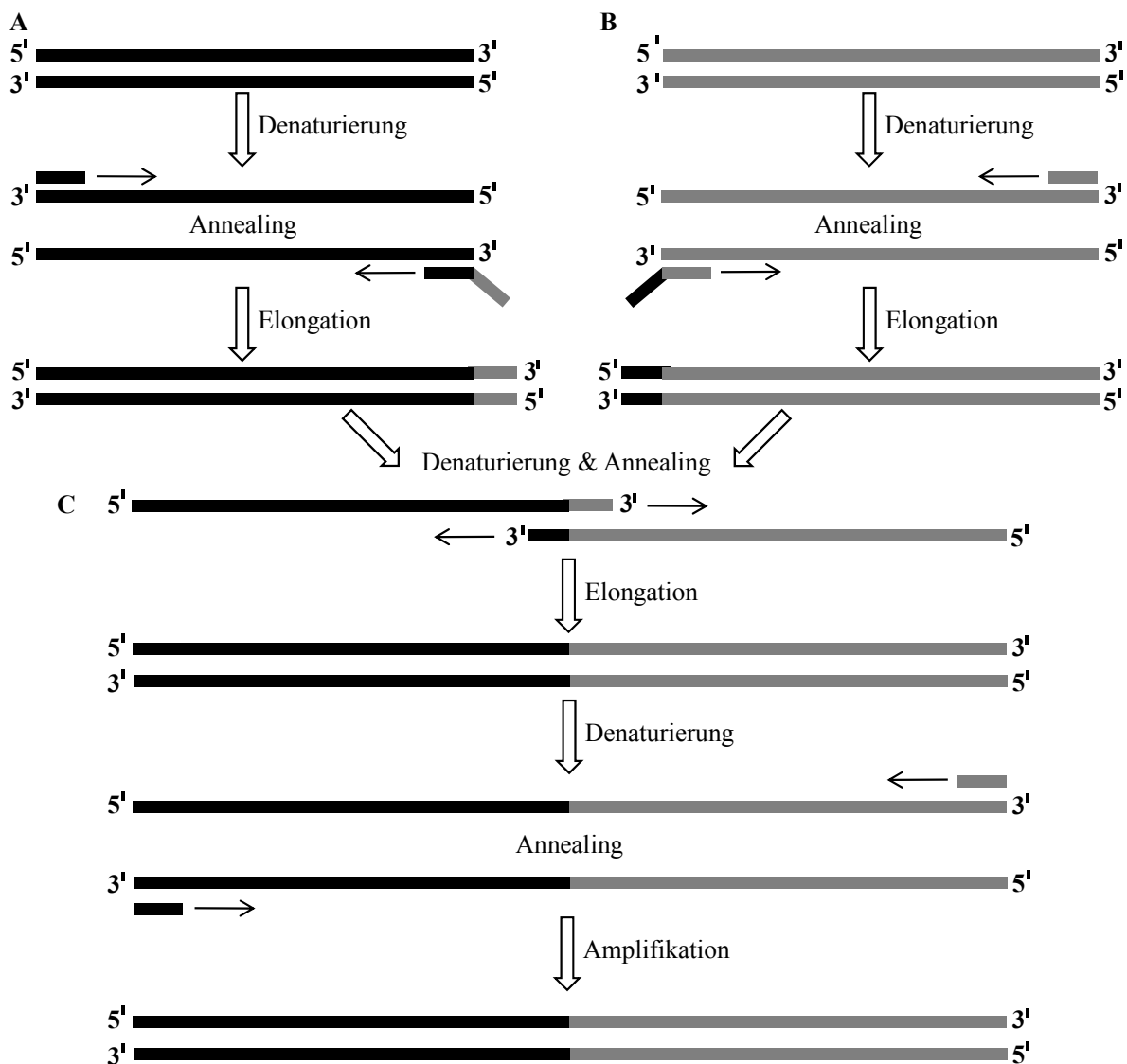


Abb. 2.1: Schematische Darstellung einer Fusions-PCR

(A) und (B) Herstellung der zu fusionierenden Fragmente. Diese beinhalten jeweils einen zur anderen Sequenz komplementären Anteil (schwarz bzw. grau). (C) Fusion beider Genabschnitte. Dabei vermitteln die beiden komplementären Bereiche die Bindung zwischen den beiden separaten PCR-Produkten. Die kürzeren Abschnitte stellen die Primer dar.

2.2.1.1.1.3 *Taq*-PCR

Die *Taq*-PCR wurde für die Auswahl von Bakterienkolonien während der Klonierung verwendet und wird deshalb in diesem Zusammenhang auch Kolonie-PCR genannt. Die Syntheserate der *Taq*-Polymerase beträgt etwa 1 kb pro Minute. Sie ist damit schneller als die *Pfu*-Polymerase, weist aber auch eine höhere Fehlerrate auf. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden nicht zur Klonierung verwendet. Die Versuchsdurchführung folgte den Angaben des Enzym-Herstellers (Fermentas), dessen *Taq*-Reaktionspuffer ebenfalls verwendet wurde.

25 µl Reaktionsansatz:	15,5 µl	dH ₂ O
	2,5 µl	10 x <i>Taq</i> -Reaktionspuffer
	2,5 µl	dNTPs
	1 µl	DMSO
	1 µl	MgCl ₂ (25 mM)
	1 µl	<i>forward</i> Oligonukleotid (10 µM)
	1 µl	<i>reverse</i> Oligonukleotid (10 µM)
	0,5 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)

Als DNA-Matrize dienten Kolonien transformierter Bakterien, welche von den Ligationsplatten mittels eines sterilen Zahnstochers in die PCR-Reaktionsgefäße überführt wurden.

<i>Taq</i> -PCR-Programm: Initiale Denaturierung	95°C	5 Minuten	} 30 x
Denaturierung	95°C	1 Minute	
Annealing	55°C	1 Minute	
Elongation (je nach Produktlänge)	72°C	variabel	
Abschließende Elongation	72°C	7 Minuten	
Kühlung	10°C	∞	

2.2.1.1.2 Restriktion

Die hydrolytische Spaltung von DNA erfolgte durch Typ-II Restriktionsendonukleasen nach den Angaben des Enzymherstellers (Fermentas) in dessen Reaktionspuffern. Es wurden dazu 1 bis 2 µg DNA in einem 50 µl Ansatz bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert. Für die gleichzeitige Verwendung zweier Enzyme in einem sogenannten Doppelverdau wurden die Reaktion ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese voneinander getrennt.

2.2.1.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach Größe in einem 1 bis 2 % Agarosegel in 1 x TAE-Puffer. Die Agarose wurde durch Erwärmen im TAE-Puffer gelöst und diesem 5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung pro 100 ml Agaroselösung hinzugegeben. Als Größenstandard wurde die 1 kb-DNA-Leiter (Roche) verwendet. Vor dem Auftragen wurden eine entsprechende Menge an 5 x DNA-Ladepuffer zur Probe hinzugegeben. Dieser beendet eine möglicherweise noch ablaufende Reaktion und zum anderen färbt und beschwert er die Probe, so dass diese einfacher aufzutragen ist. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 50 bis 120 V. Die Detektion und Dokumentation wurde mittels UV-Dokumentationsanlage (Intas) durchgeführt. Dieser Nachweis beruht darauf, dass das Ethidiumbromid in die Helix der DNA interkaliert. Der entstandene Komplex ist mit UV-Licht anregbar.

2.2.1.1.4 Gelelution

Die Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mittels des “High Pure PCR Product Purification Kits“ (Roche) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Die gewünschten Banden wurden dazu unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten.

2.2.1.1.5 Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung linearisierter Vektoren mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) erfolgte nach Angaben des Herstellers (Fermentas). Dazu wurden dem Restriktionsansatz 2 µl CIAP (1 U/µl) für 30 Minuten bei 37°C zugegeben. Die dephosphorylierten DNA-Enden können nicht mehr miteinander oder mit sich selbst ligieren. Eine Dephosphorylierung des Vektors vor der Ligation mit dem Insert erhöht dadurch die Ausbeute an gewünschtem Ligationsprodukt.

2.2.1.1.6 Ligation

Die DNA-Fragmente wurden mittels T4-DNA-Ligase nach Vorschrift des Herstellers (Fermentas) in kompatible Schnittstellen von dephosphorylierten Plasmidvektoren ligiert. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug etwa 1:3. Die Inkubation erfolgte bei 17°C über Nacht im Wasserbad. Die Ligase wurde anschließend für 10 Minuten bei 65°C inaktiviert, um die Transformationseffizienz des Ansatzes zu erhöhen.

2.2.1.1.7 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

E. coli XL-I Blue Zellen kodieren in ihrer genomischen DNA eine Tetrazyclin-Resistenz. Alle Medien wurden deshalb mit diesem Antibiotika versehen. Zunächst wurden mittels Impföse XL-I Blue Zellen auf einer LB-Platte vereinzelt. Mit einer Kolonie dieser Platte wurde eine 50 ml Vorkultur angeimpft. Von dieser wurden 20 ml zur Anzucht in 1 Liter LB-Medium verwendet und dieses bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 kultiviert.

Die Bakterienlösung wurde auf viermal 250 ml aufgeteilt und 15 Minuten bei 2.400 g und 4°C abzentrifugiert (J2-HS, JA14-Rotor, Beckman). Alle bei den folgenden Waschschrritten entstandenen Überstände wurden verworfen. Die Pellets wurden zunächst in je 10 ml eiskaltem dH₂O resuspendiert. Je zwei Pellets wurden vereint und mit eiskaltem Wasser auf 250 ml aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation wurde dieser Schritt zur Entsalzung der Bakterien-suspension wiederholt. Danach wurden die Pellets vorsichtig in 10 ml eiskalter, sterilfiltrierter 10 % Glycerin-Lösung resuspendiert und in 50 ml Schraubdeckelröhrchen gegeben. Die bisher verwendeten Zentrifugenbecher wurden in mehreren Schritten mit insgesamt 40 ml Glycerin-Lösung gespült und diese mit der Bakteriensuspension vereinigt.

Die Lösungen wurden bei 2.200 g (Multifuge 3SR+, Heraeus) und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert und die Pellets in 2 ml Glycerin-Lösung aufgenommen. Aliquots von 50 µl wurden bei -80°C gelagert. Die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Rosetta Zellen folgte dem gleichen Protokoll, nur wurde dabei Chloramphenicol als Antibiotikum verwendet.

2.2.1.1.8 Elektroporation

Die Transformation 50 µl elektrokompetenter *E. coli* Zellen mit 0,1 bis 1 µg Plasmid-DNA bzw. 2 µl inaktiviertem Ligationsansatz erfolgte in Küvetten von 2 mm Spaltbreite durch Elektroporation (Gene Pulser: 400 Ω Widerstand, 25 µF Kapazität, 2,5 kV Spannung). Frisch transformierte Zellen wurden in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurden durch Zentrifugation für 2 Minuten bei 2150 g pelletiert und in 100 µl Überstand resuspendiert. Die Bakterien wurde auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika selektioniert.

2.2.1.1.9 Bakterienanzucht

Die Anzucht aller *E. coli* Zellen erfolgte in LB-Medium. Festmedien wurden im Brutschrank bei 37°C für 12 bis 16 Stunden inkubiert. Flüssigmedien wurden bei 220 Upm und 37°C ebenfalls über Nacht geschüttelt. Zum Animpfen der Flüssigkulturen dienten dabei sterile Zahnstocher. Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes wurden allen Medien die jeweils benötigten Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

Ampicillin	50 µg/ml
Kanamycin	30 µg/ml
Tetrazyklin	20 µg/ml
Chloramphenicol	100 µg/ml (in Ethanol gelöst)

Von einigen, häufig benötigten Bakterienkulturen wurden Glycerin-Stocks angelegt, um ohne erneute Transformation darauf zurückgreifen zu können. Dazu wurden 100 µl Glycerin mit 900 µl Bakterienkultur vermischt und bei -80°C gelagert. Für eine erneute Anzucht wurde ein Teil des Stocks mit einer Impföse abgekratzt und in LB-Medium gegeben.

2.2.1.1.10 Plasmid-Isolierung

Plasmid-DNA wurde im kleinen Maßstab aus 3 ml *E. coli* Schüttelkulturen mittels des „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ (PeqLab) oder des „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ (Fermentas) nach Vorschrift der Hersteller isoliert. Die Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA aus 50 ml Bakterienkultur wurde mittels des „PureYield Plasmid Midiprep System“ (Promega) nach Angaben der Firma durchgeführt.

2.2.1.1.11 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen erfolgte mit Hilfe eines Photometers (GeneQuant pro, Biochrom). Sie beruht auf der Absorption von doppelsträngiger DNA bei 260 nm, wobei die Integrität der vermessenen DNA nicht berücksichtigt wird.

2.2.1.1.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide wurde als Auftragsarbeit von den Firmen MWG Biotech (Martinsried) und GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt. Das Prinzip der Sequenzierung geht auf die Didesoxy-Methode von Sanger *et al.* (1977) zurück, wobei fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) zu einem Kettenabbruch in der PCR-Reaktion führen. Ein Reaktionsabbruch kann statistisch verteilt über das gesamte Produkt erfolgen. Die so entstehenden Fragmente unterschiedlicher Länge werden in einer Kapillare aufgetrennt und deren Fluoreszenz detektiert. Jeder Base ist dabei eine bestimmte Wellenlänge zugeordnet.

2.2.1.2 Protein-Techniken

Abb. 2.2 gibt eine Übersicht über die wesentlichen Schritte der Proteinanalyse und stellt die angewendeten Methoden im Zusammenhang dar.

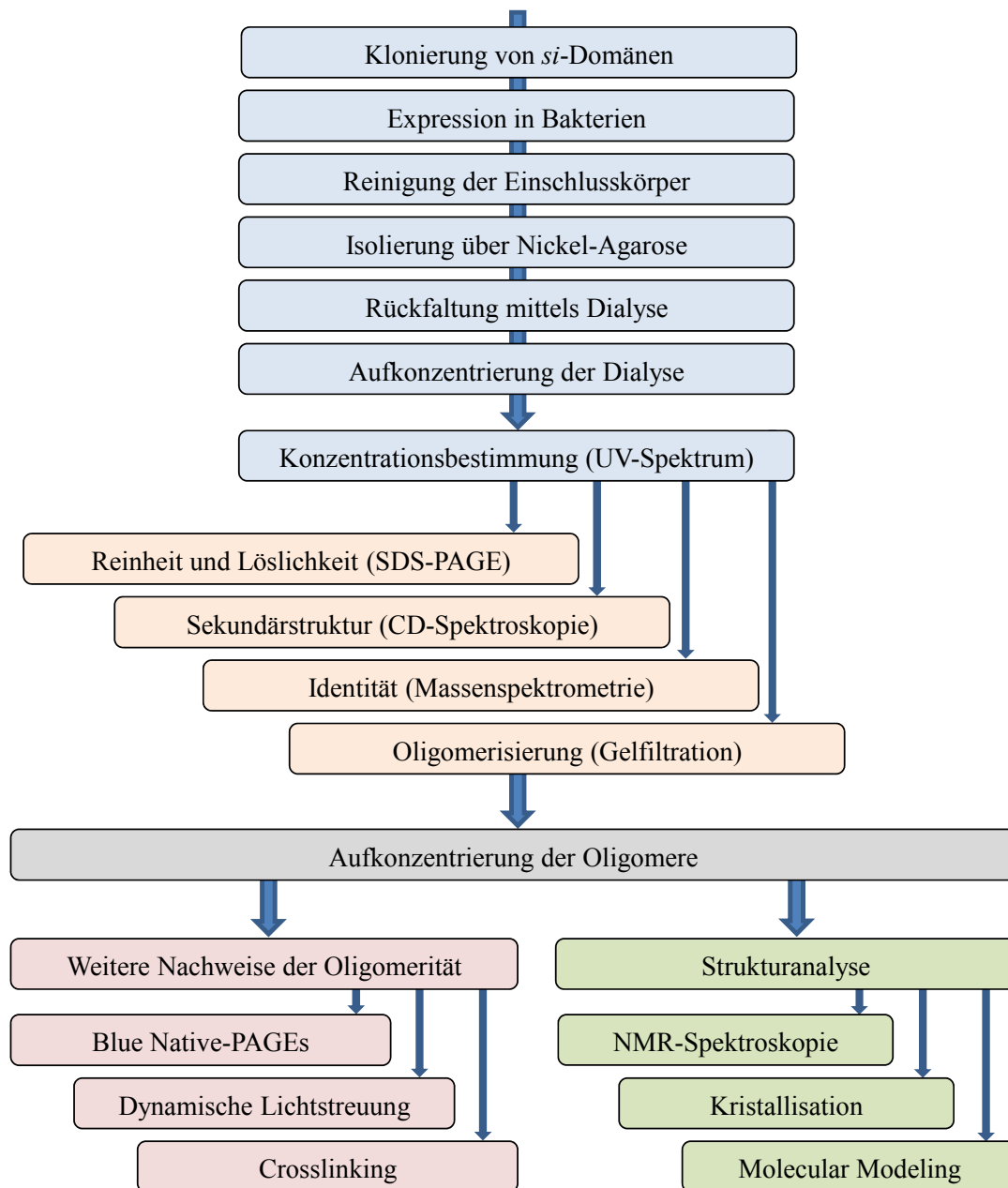


Abb. 2.2: Übersicht über die wesentlichen Schritte der Proteinanalyse
 Zwischenschritte oder Wiederholungen sind für das bessere Verständnis nicht dargestellt.

2.2.1.2.1 Expression von Protein in Bakterien

Zur Expression der rekombinanten Proteine wurden kompetente *E. coli* Rosetta Zellen mittels Elektroporation mit dem gewünschten Konstrukt transformiert. Der gesamte Ansatz wurde nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C in eine 50 ml LB-Kultur gegeben. Diese enthielt zwei Antibiotika: Kanamycin als Selektionsmarker für das Protein-kodierende Plasmid und Chloramphenicol, dessen Resistenz durch das Plasmid pRARE vermittelt wird. Dadurch, dass der verwendete Bakterienstamm dieses zusätzliche Plasmid trägt, soll ein Abbruch der Translation aufgrund eines tRNA-Mangels minimiert werden.

1 Liter LB-Medium mit Antibiotika wurde mit 20 ml Vorkultur angeimpft und auf eine OD_{600} von 0,5 bis 0,8 angezogen. Dies dauerte etwa 3,5 Stunden. Dann wurde die Expression der Proteine durch die Zugabe von 1 mM IPTG Endkonzentration für 3 Stunden bei 37°C induziert. Diese Bedingungen sind besonders für die Gewinnung von unlöslichem Protein in Form von Einschlusskörpern, sogenannten *Inclusion Bodies* geeignet. Diese bestehen hauptsächlich aus induzierten Proteinen, welche zusammen mit anderen Verbindungen wie Membranproteinen, Phospholipiden, Nukleinsäuren und Chaperonen ein unlösliches Agglomerat bilden (Ventura & Villaverde, 2006). Nach Ende der Induktion wurden die Bakterien bei 5000 g und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen. Die Pellets wurden bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.2.1.2.2 Bakterienlysis

Die Bakterienpellets von 1 bis 2 Liter Medium wurden auf Eis aufgetaut und in 90 ml Lysispuffer aufgenommen. Die Lösung wurde in kleinere Zentrifugenbecher überführt und 100 mg Lysozym in 10 ml Lysispuffer zugegeben. Nach der vollständigen Resuspension folgten 30 Sekunden maximale Ultraschall-Behandlung auf Eis. Dann wurde das Homogenisat 30 Minuten unter gelegentlichem Schütteln auf Eis inkubiert. Die löslichen Bestandteile der Bakterien wurden schließlich durch 15 Minuten bei 19.000 g und 4°C (J2-HS, JA14-Rotor, Beckman) abgetrennt. Die Einschlusskörper befanden sich im Pellet.

2.2.1.2.3 DNase/RNase-Verdau

Das Pellet wurde in 100 ml DNase/RNase-Puffer resuspendiert und 30 s mit maximalem Ultraschall behandelt. Der homogenen, aber viskosen Lösung wurden 5 µg/ml DNase- und 5 µg/ml RNase-Lösung zugegeben. Die Suspension wurde 3 bis 4 Stunden bei 37°C und 220 Upm geschüttelt, bis ihre Konsistenz dünnflüssig war. Diese Veränderung beruhte auf der Hydrolyse der Nukleinsäuren. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 19.000 g und 4°C (J2-HS, JA14-Rotor, Beckman) wurde der Überstand verworfen.

2.2.1.2.4 Aufreinigung von Einschlusskörpern

Die gewonnenen Einschlusskörper wurden durch mehrmaliges Resuspendieren, Ultraschallen und Zentrifugieren gereinigt. Zu Beginn wurde dreimal der Waschpuffer I mit Tween-20 und einer hohen Salzkonzentration verwendet. Bei der Tensid-Konzentration ist entscheidend, dass diese zum einen die Membranen auflöst, aber zum anderen unter der kritischen Mizell-

Konzentration bleibt, so dass die Einschlusskörper nicht durch die Ausbildung von Mizellen in Lösung übergehen.

Das Pellet wurde immer in 20 ml Puffer mit Hilfe einer 5 ml Plastikpipette gut resuspendiert und dann für 30 s mit maximalem Ultraschall auf Eis behandelt. Die Lösung wurde auf 200 ml Puffer aufgefüllt und anschließend zentrifugiert (4.750 g, 15-30 Minuten, 4°C, J2-HS, JA14-Rotor, Beckman). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit jedem Waschschrift sichtbar heller und lockerer, aber auch weniger. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit Waschpuffer II (geringe Salzkonzentration, kein Detergenz) gereinigt. Die erste Zentrifugation erfolgte dabei bei 4.750 g, die zweite bei 3.500 g. Danach wurden die Einschlusskörper in 50 ml Schraubdeckelröhrchen überführt, beschallt und bei maximaler Umdrehung (Multifuge 2, Heraeus Christ) für 30 Minuten abzentrifugiert. Bei kleineren Pellets waren weniger Waschschriffe, sowohl im ersten, wie auch im zweiten Puffer, nötig. Die Ausbeute wurde gewogen und die Einschlusskörper bei -20°C gelagert.

2.2.1.2.5 Schnelles Verdünnen

Die Löslichkeit eines Proteins in einem bestimmten Puffer gibt grundsätzlich keinen Aufschluss über dessen Faltung. Allerdings lässt sich festhalten, dass sehr hohe Konzentrationen in der Regel nur durch die vollständige Faltung vermittelte Löslichkeit zu erreichen sind (Löffler & Petrides, 2003). Dabei liegen die hydrophoben Anteile im Inneren des gefalteten Proteins vor dem wässrigen Lösungsmittel verborgen (Löffler & Petrides, 2003).

Die Reinheit und Löslichkeit der Einschlusskörper konnte mit Hilfe des schnellen Verdünnens von hochkonzentrierter Proteinlösung in verschiedenen Puffer überprüft werden. Dazu wurden etwa 10 mg der Einschlusskörper eingewogen und in 6 M Gu HCl zu 100 mg/ml gelöst. Die Lösung war leicht gelblich und viskos. Davon wurden 5 µl in Reaktionsgefäße vorgelegt und durch die Zugabe von 245 µl Puffer schnell verdünnt (1:50). Um die Proteinlösung schnell umzupuffern, ist das Vorlegen dieser Lösung entscheidend. In der Regel fiel ein unlöslicher Anteil aus.

Für die Analyse der pH-Abhängigkeiten wurden verschiedene Puffer von pH 3 bis pH 12 verwendet. Die Proben wurden für wenige Sekunden abzentrifugiert und 32 µl des Überstandes mit 8 µl 5 x reduzierendem Ladepuffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Sie konnten dann mittels SDS-PAGE analysiert werden. Neben der Auftrennung auf denaturierenden Gelen konnten die Ansätze auch für Blue-Native-PAGE eingesetzt werden, wobei der Blue-Native Ladepuffer verwendet wurde. Um den Nukleinsäuregehalt der Einschlusskörper abzuschätzen, wurden schnell verdünnte Proben auch auf Agarosegelen analysiert.

2.2.1.2.6 Aufreinigung über Nickel-Agarose

Die His₆-markierten Proteine wurden im sogenannten *batch*-Verfahren über Nickel-Agarose (Ni-NTA-Agarose) als Affinitätsmaterial aufgereinigt. Sie erfolgte im denaturiertem Zustand bei RT. Die Nickel-Agarose-Perlen liegen als 50%ige alkoholische Suspension vor. Deswegen wurden vor ihrer Verwendung je 5 ml davon zweimal mit 6 M Gu HCl, 50 mM Tris, pH 8 in einem 50 ml Schraubdeckelröhrchen gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 2260 g für 15 Minuten und Raumtemperatur (RT). Pro ml Volumen können die Perlen 5 bis 10 mg His₆-markiertes Protein binden (Angabe des Herstellers). Dazu wurden etwa 40 mg Einschlusskörpern ebenfalls in 6 M Gu HCl, 50 mM Tris, pH 8 gelöst. Unlösliche Bestandteile wurden mittels Zentrifugation abgetrennt. Das gelöste Protein wurde zur Nickel-Agarose gegeben und durch zweistündige Inkubation auf dem Rollkippschüttler eine Bindung ermöglicht. Der Überstand wurde abzentrifugiert und aufbewahrt.

Um unspezifisch haftende Proteine zu entfernen, wurde die Nickel-Agarose dreimal mit 6 M Gu HCl, 50mM Tris, 20 mM Imidazol, pH 8 gewaschen: Dafür wurden die Perlen 10 Minuten auf dem Rollkippschüttler inkubiert. Die geringe Imidazol-Konzentration konkurriert dabei mit schwacher, unspezifischer Bindung, welche sie dadurch lösen sollte. Zur Elution des gereinigten Proteins wurde die Nickel-Agarose 30 Minuten mit 4 ml 6 M Gu HCl, 50 mM Tris, 250 mM Imidazol, pH 8 inkubiert und dann zentrifugiert. Der Überstand enthielt das abgelöste Protein. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal wiederholt und die Überstände vereinigt.

2.2.1.2.7 Dialyse

Die Renaturierung der Proteine erfolgte mittels Dialyse gegen verschiedene Puffer. Dazu wurden die 12 ml Eluat von der Nickel-Agarose in einen Dialyseschlauch gegeben. Im Becherglas wurde dann für dreimal mindestens 4 Stunden unter Rühren der Pufferaustausch ermöglicht. Das Dialysat wurde dem Schlauch entnommen und bei maximaler Umdrehung (Multifuge 2, Heraeus Christ) für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet, welches aus gereinigtem, aber unlöslichen Protein bestand, wurde aufbewahrt. Das lösliche Protein im Überstand konnte direkt analysiert werden.

2.2.1.2.8 Konzentrierung von Proteinlösungen

Zur Konzentrierung von Dialysaten wurden Ultrafiltrationseinheiten verwendet. (Vivascience). Ein Reservoir mit der Proteinlösung befindet sich dabei über einer Membran mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa. Durch Zentrifugation gelangen der Puffer und kleinere Peptide

durch die Membran, während sich die größeren Proteine im oberen Reservoir anreichern. Mit dieser Methode konnten Konzentrationen von bis zu 80 mg/ml erreicht werden.

2.2.1.2.9 TCA-Fällung

Unter anderem bei der Analyse von Fraktionen der SEC war es nötig, stark verdünnte Proteinlösungen auf ein sehr kleines Volumen einzuengen. Dazu wurde eine Probe in einem Corex-Röhrchen mit dem gleichen Volumen an 20 % Trichloressigsäure (TCA) versetzt und 30 Minuten auf Eis gekühlt. Ansäuerung und Kälte führte zur Denaturierung der Proteine. Diese wurde durch 10 Minuten bei 19.000 g und 4°C (J2-HS, JA14-Rotor, Beckman) gefällt und das Pellet mit 1 ml eiskaltem Acetons gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Proteinpellet bei 37°C getrocknet. Es konnte dann in 1 x reduzierendem Ladepuffer aufgenommen und auf einer SDS-PAGE analysiert werden.

2.2.1.2.10 Protein- und Peptid-Konzentrationsbestimmung

Die genaue Bestimmung der Proteinkonzentration ist unter anderem für die Normierung von CD-Spektren bedeutsam. Auch bei der Mischung verschiedener Peptide und Proteine miteinander ist sie für deren genaues Verhältnis zueinander entscheidend. Da die Aminosäuresequenzen der verwendeten Konstrukte bekannt sind, war es möglich, über die Messung der Absorption im UV-Bereich die Konzentrationsbestimmung durchzuführen. Die Absorption wird dabei je nach Wellenlänge zu unterschiedlichen Anteilen von aromatischen Aminosäureresten, Disulfidbrücken oder Peptidbindungen verursacht. Dieses Verfahren ist bei reinen Proteinlösungen spezifischer als die klassische Konzentrationsbestimmung nach Bradford.

Die Aufnahme der UV-Spektren erfolgte mittels des „Nanodrop ND-1000“ Photometers (PeqLab) von 240 nm bis 320 nm für Proteine und ab 200 nm bei Peptiden. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nachdem als Referenz die Absorption des jeweiligen Puffers ohne Protein vermessen worden war, ermöglichte das Gerät eine schnelle Aufnahme der Spektren bei minimalem Einsatz von Proteinlösung (2 µl). Die Auswertung der photometrischen Messungen erfolgte unter Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes:

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c_m \cdot d \quad \text{Ggl. 1}$$

mit E_{λ} : Absorption bei der Wellenlänge λ
 ϵ_{λ} : molarer Absorptionskoeffizient bei der Wellenlänge λ in [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
 c_m : molare Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit in [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]
 d : Schichtdicke in [cm]

Bei bekannter Schichtdicke d und molarem Absorptionskoeffizienten ϵ_λ lässt sich somit die molare Konzentration c_m aus der Absorptionsmessung bestimmen. Durch Multiplikation mit der Molekularmasse M_r kann die Konzentration c errechnet werden:

$$c = c_m \cdot M_W \quad \text{Ggl. 2}$$

mit M_W : Molekulargewicht [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]
 c : Konzentration [$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]

Eine vollständige Tabelle der molaren Absorptionskoeffizienten und Molmassen befindet sich in Anhang IV.

Der molare Absorptionskoeffizient ϵ_{280} für Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm ergibt sich wie folgt:

$$\epsilon_{280} = 5500 \cdot n_{\text{Trp}} + 1490 \cdot n_{\text{Tyr}} + 125 \cdot n_{\text{SS}} \quad [\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] \quad \text{Ggl. 3}$$

mit n_{Trp} : Anzahl der Tryptophanreste
 n_{Tyr} : Anzahl der Tyrosinreste
 n_{SS} : Anzahl der Disulfidbrücken

Da Peptide aus wenigen Aminosäuren bestehen, und damit die Anzahl an aromatischen Resten gering ist, wurde bei diesen die Absorption der Peptidbindung bei etwa 214 nm zur Konzentrationsbestimmung herangezogen. Dabei gilt:

$$c_{\text{Pep}} = \frac{E_{214}}{Q} \quad \text{Ggl. 4}$$

mit c_{Pep} : Konzentration [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]
 E_{214} : Absorption bei 214 nm
 Q : spezifischer Absorptionskoeffizient [$\text{ml} \cdot \text{mg}^{-1}$]

Der spezifische Absorptionskoeffizient Q wurde für jedes Peptid und dessen jeweilige Aminosäuresequenz wie folgt errechnet (Buck *et al.*, 1989):

$$Q = \frac{\{(n-1+n_{\text{Asn}}+n_{\text{Gln}}) \cdot e_{\text{Pep}} + (n_{\text{Trp}} \cdot e_{\text{Trp}}) + (n_{\text{Phe}} \cdot e_{\text{Phe}}) + (n_{\text{His}} \cdot e_{\text{His}}) + (n_{\text{Tyr}} \cdot e_{\text{Tyr}})\}}{M_r} \quad \text{Ggl. 5}$$

mit Q : spezifischer Absorptionskoeffizient [$\text{l} \cdot \text{g}^{-1}$]
 n : Gesamtzahl der Aminosäurereste,
 dadurch ergibt $(n-1)$ die Anzahl der Peptidbindungen
 n_{AS} : Anzahl der jeweiligen Aminosäure
 e_{AS} : molarer Absorptionskoeffizient der jeweiligen Aminosäure bei 214 nm
 e_{Pep} : mittlerer molarer Absorptionskoeffizient der Peptidbindung bei 214 nm

Die molaren Absorptionskoeffizienten ϵ bei 214 nm betragen:

$$\begin{aligned} \epsilon_{\text{Pep}} &= 2846 \text{ [l}\cdot\text{mol}^{-1}] \\ \epsilon_{\text{Phe}} &= 7208 \text{ [l}\cdot\text{mol}^{-1}] \\ \epsilon_{\text{His}} &= 6309 \text{ [l}\cdot\text{mol}^{-1}] \\ \epsilon_{\text{Trp}} &= 22735 \text{ [l}\cdot\text{mol}^{-1}] \\ \epsilon_{\text{Tyr}} &= 5755 \text{ [l}\cdot\text{mol}^{-1}] \end{aligned}$$

2.2.1.2.11 Crosslinking

Um den Oligomerisierungszustand eines Proteins zu bestimmen, kann die chemische Verknüpfung (*Crosslinking*) der im Komplex befindlichen Untereinheiten und die anschließende Analyse der Reaktionsprodukte mittels Western-Blot verwendet werden. Dazu wurden aufkonzentrierte Tetramere der N-terminal His-markierten *si*-Domäne von *KCNQ2* (*Q2pET30*) in 50 mM CAPS pH 11 (25 mg/ml) mit PBS pH 7,3 schnell auf eine Konzentration von 0,156 mg/ml verdünnt. Anschließend wurde 1/10 des Volumen an wässriger Sulfo-EGS-Lösung ([Ethylen glycolbis(sulfosuccinimidylsuccinat)], Pierce) bis zu einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben. Die Reaktion zwischen den ϵ -Aminogruppen von Lysinresten oder der α -Aminogruppe des N-Terminus des Proteins mit dem *Crosslinker* läuft dabei aus chemischen Gründen bei pH 7-9 am günstigsten ab.

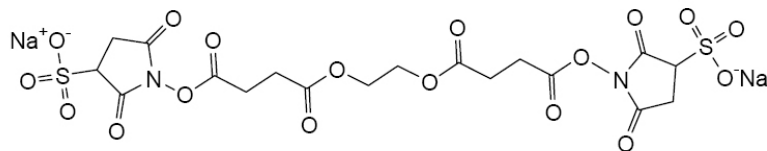


Abb. 2.3: Struktur des Sulfo-EGS (Protokoll des Herstellers)

Die Vernetzung erfolgt auf Eis für unterschiedliche Zeiten (0, 20, 40 s und 1, 5, 10 Minuten). Die nasschemische Reaktion verlief dabei nach statistischen und sterischen Regeln. Sulfo-EGS besitzt zwei reaktive Enden (Abb. 2.3), welche mit örtlich benachbarten Aminogruppen reagieren können. Für eine Verbindung von Monomeren ist es nötig, dass ein *Crosslinker*-Molekül sich mit Aminogruppen von zwei unterschiedlichen Untereinheiten eines Multimers verbindet. Reaktive Gruppen können dabei alle Lysinresten oder die endständigen N-Aminogruppen sein.

Das molare Verhältnis des *Crosslinkers* zum Protein darf dabei nicht zu hoch sein, weil dann die Aminogruppen mit nur einem Ende des Sulfo-EGS reagieren und keine Vernetzung stattfinden. Zum anderen würde bei einem zu geringen Verhältnis keine ausreichende Verknüpfung der Untereinheiten miteinander erfolgen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1/10 Volumen frischer Lysin-Lösung mit einer Endkonzentration von 100 mM und 15 Minuten Inku-

bation bei RT beendet. Die Aminogruppen des Lysins reagieren dabei mit den noch freien Enden des Sulfo-EGS ab. Als Negativkontrolle wurde das Protein mit Wasser statt *Crosslinker* inkubiert.

Nach Zugabe von 5 x reduzierendem Ladepuffer für SDS-PAGE wurden die Proben auf „NuPAGE“ Gradientengelen (Invitrogen) mit 1 x MOPS- Puffer in einer SDS-PAGE-Elektrophoresekammer (Invitrogen) aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert. Beim direkten Nachweis der Reaktionsprodukte in der SDS-PAGE mittels Coomassie-Färbung wurde eine Proteinlösung von 0,625 mg/ml *Q2pET30 Tetrameren* mit 2,5 mM Sulfo-EGS Endkonzentration inkubiert.

2.2.1.2.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die diskontinuierliche, elektrophoretische Auftrennung von Proteinen. Dabei werden die Proteine durch Zugabe von SDS und Erwärmung denaturiert. Die Auftrennung erfolgt nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Die dafür benötigten Gele waren 1,5 mm dick und hatten 10 Taschen zum Probenauftrag, welche je etwa 40 µl Probe fassten. Die Herstellung der Gele erfolgt nach Tab. 2.12.

Die Auftrennung erfolgte in „Mini-Protean 3“ Elektrophoresekammern (BioRad) in 1 x SDS-Elektrodenpuffer bei 100 bis 140 V. Zuvor wurden die Proben mit reduzierendem 5 x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Als Molekulargewichtsmarker wurden voreingefärbte oder ungefärbte Protein-Standards verwendet. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront, sichtbar durch das im Ladepuffer enthaltene Bromphenolblau, das Ende des Geles erreicht hatte.

	Trenngel		Sammelgel
	8 %	15 %	4,5 %
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	2,5 ml
30% Acrylamidlg	2,66 ml	5 ml	1,125 ml
Wasser	4,74 ml	2,41 ml	6,285 ml
10% APS	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl

Tab. 2.12: Pipettierschema für SDS-PAGE

2.2.1.2.13 Coomassie-Färbung von SDS- oder Blue-Native-PAGE

Proteine in Polyacrylamid-Gelen konnten durch Anfärben nachgewiesen werden. Dafür wurde das Gel 1 bis 3 Stunden bei RT in Coomassie-Färbelösung geschüttelt, bis es eine

tiefblaue Färbung angenommen hatte. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte mittels Coomassie-Entfärber über Nacht bei RT. Eine weitere Entfärbung konnte über die Umlagerung in Wasser verhindert werden. Für die rein quantitative Analyse wurde Coomassie Brilliant Blue R-250 eingesetzt. Bei BN-PAGE und Gelen für eine massenspektrometische Analyse wurde hingegen das kolloidale Coomassie Brilliant Blue G-250 verwendet.

2.2.1.2.14 Trocknung von SDS- oder Blue-Native-PAGE

Um SDS- oder BN-PAGE langfristig aufzubewahren, wurden diese getrocknet. Dazu wurden die Gele zunächst über Nacht in Wasser gelegt, um so andere Lösungsmittel aus dem Gel zu verdrängen. Die PAGE wurden dann feucht und luftblasenfrei zwischen zwei Cellophan-Folien (BioRad) gelegt und diese in einem Rahmen eingespannt. Sie wurden dann im Heizlüfter (BioRad) vollständig getrocknet.

2.2.1.2.15 Western-Blot

Der Transfer von in SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf eine PVDF-(Polyvinyliden Difluorid) Membran erfolgte im sogenannten Tank-Blot-Verfahren. Dazu wurde zunächst die Membran 15 Minuten in Methanol equilibriert und anschließend in Wasser gewaschen. Danach wurde sie in 1 x Tank-Blot-Puffer überführt. In einem für die Tank-Blot-Apparatur (BioRad) vorgesehenen Schlitten wurden luftblasenfrei und mit reichlich Tank-Blot-Puffer folgende Schichten angeordnet (von der Kathode zur Anode):

1 Schwamm
1 Whatman-Papier
SDS-PAGE
PVDF-Membran
1 Whatman-Papier
1 Schwamm

Der Schlitten wurde in die Tank-Blot-Apparatur eingeführt, diese mit einem -20°C kalten Kühlelement versehen, mit eisgekühltem Puffer aufgefüllt und der Transfer für 2 Stunden bei 800 mA unter ständigem Rühren auf Eis vollzogen.

2.2.1.2.16 Ponceau-Färbung von PVDF-Membranen

Um die Beladung und die Qualität von Western-Blots zu überprüfen, konnten diese im Anschluss an das Blotting mit Ponceau-S-Lösung angefärbt werden. Die PVDF-Membran wurde für 3 Minuten in dieser geschüttelt und anschließend mit dH₂O solange entfärbt, bis

sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben. Die Ponceau-S-Lösung wurde im Dunkeln gelagert und konnte mehrfach verwendet werden.

2.2.1.2.17 Immunologische Nachweis

Nach einer möglichen Ponceau-Färbung wurde die PVDF-Membran für 30 Minuten bei RT in Western-Blot Blockierlösung geschüttelt. Die Inkubation mit Proteinen aus Milch soll dabei die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran durch deren Absättigung verhindern. Danach wurde der Primärantikörper, ebenfalls in Western-Blot Blockierlösung, für 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einem Rollkippschüttler mit der Membran inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Antikörper durch dreimal 5 minütiges Waschen in TBS-Tween entfernt. Mit dem POD-gekoppelten Sekundärantikörper wurde wie mit dem Primärantikörper verfahren. Um einen geringen Hintergrund bei der Detektion zu erhalten, wurden die Waschschritte allerdings für dreimal 30 Minuten durchgeführt. Anschließend konnte der Blot mit Western-Blot-Detektionslösung (Amersham) in der Chemilumineszenz-Anlage (Fujifilm) detektiert werden.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Größenausschlusschromatographie (SEC)

In der Größenausschlusschromatographie, auch *size exclusion chromatography* (SEC), werden Proteine in Lösung nach ihrer nativen Größe aufgetrennt, d.h., in diesem Verfahren kann die Anzahl der Untereinheiten in einem Oligomer des Proteins bestimmt werden. Auch lassen sich so miteinander interagierende Proteine in Komplex auftrennen. Dazu wurde die „ÄKTA explorer“ SEC-Anlage (Amersham Pharmacia) mit verschiedenen Säulen bei 4°C eingesetzt. Die Kalibrierung der SEC-Säulen erfolgte mit verschiedenen Proteinen, unter anderem aus dem „LMW und HMW Calibration Kit“ (Amersham Bioscience) entsprechend den Angaben des Herstellers.

Prinzip der Trennung ist, dass unterschiedlich große und unterschiedlich geformte Proteine in dem Säulenmaterial einen unterschiedlich langen Weg zurücklegen. Großen Proteinen sind kleinere Poren nicht zugänglich, sie legen einen kürzeren Weg zurück. Der Weg kleinerer Proteine verlängert sich hingegen durch den Fluss durch kleinere Poren. Dadurch werden sie zurückgehalten und verlassen die SEC-Säule später. Die Auftrennung erfolgt im Wesentlichen nach Molekülgröße, wobei diese durch den hydrodynamischen Radius vergrößert erscheint. Die Form der aufgetrennten Proteine beeinflusst außerdem die Auftrennung, da globuläre oder stäbchenförmige Teilchen unterschiedliches Fließverhalten aufweisen.

Der Größenbereich, in der die Säule optimal trennt, ist vom Säulenmaterial abhängig. In allen Fällen gibt es aber Aggregate, deren Molekulargewicht das Trennvermögen überschreiten. Diese Komplexe werden nicht aufgetrennt und verlassen als unspezifischer Peak im sogenannten Ausschlussvolumen die Säule. Die Auftrennung der Proteine kann auch vom pH-Wert oder dem Salzgehalt des verwendeten Laufpuffers abhängig sein, da dieser mit dem Säulenmaterial interagiert und so die Eigenschaften der Säule modifiziert. Eine Auflistung der verwendeten SEC-Säulen und Eichgeraden findet sich im Anhang II.

2.2.2.2 Zirkularer Dichroismus (CD)-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie ermöglicht die Bestimmung der Sekundärstrukturanteile einer Proteinlösung. Die Messung erfolgt als Mittelung über alle in der Lösung vorhandenen Proteine bzw. bei reinen Lösungen über alle im Protein enthaltenen Sekundärstrukturen. Durch diese Methode kann auch eine Denaturierung von Proteinen nachgewiesen werden.

Die CD-Spektren von der zu analysierenden Proteinlösung und dem reinen Puffer wurden mit einem „J-720 Spectropolarimeter“ (Jasco) mit einer spektralen Bandbreite von 2 nm als Dreifachbestimmung von 190 bis 250 nm bei RT aufgenommen. Diese wurden stets in der gleichen Küvette aus Quarzglas (Hellma Optik) vorgenommen, so dass sich durch Subtraktion beider Spektren das eigentliche CD-Spektrum des Proteins ergab. Die Kalibrierung des CD-Spektrometers erfolgte nach Chen & Yang (1977).

Um die Temperaturstabilität und Reversibilität der Proteinfaltung zu untersuchen, konnten mittels eines Thermoelements auch Temperaturgradienten aufgenommen werden. Die Messung erfolgte dabei in einer randvollen Küvette, welche außer mit einem Stöpsel zusätzlich mit Parafilm verschlossen wurde, um so Verdunstungseffekte möglichst gering zu halten. Die Aufnahme der Daten erfolgte bei konstant 222 nm, während die Temperatur von 10 bis 90°C in 1°C-Schritten erhöht und wieder erniedrigt wurde. Vor und nach Messung der Schmelzkurve und auch bei 90°C konnte ein reguläres CD-Spektrum aufgenommen werden.

Dabei wurde in beiden Fällen die Elliptizität Θ_λ gemessen. Diese kann auf die mittlere Molmasse der Aminosäurereste MRW (*mean residue weight*) des Proteins, die Schichtdicke d sowie die Konzentration c normiert werden:

$$\Theta_\lambda^{\text{MRW}} = \frac{\Theta_\lambda \cdot \text{MRW}}{d \cdot c} \quad \text{Ggl. 6}$$

mit Θ_λ : Elliptizität [Grad]
MRW: mittlere Molekularmasse der Aminosäurereste [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]
 d : Schichtdicke der Lösung [cm]
 c : Konzentration [$\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$]

2.2.2.3 Interaktion verschiedener Proteine

Um die Interaktion der *si*-Domäne von *KCNQ2* mit derjenigen von *KCNQ3* zu untersuchen, wurden gereinigte und konzentrierte Dimere von *Q3pET30-HA* mit *Q2pET30* Tetrameren im äquimolaren Verhältnis gemischt und die Lösung für 10 Minuten im Heizblock (Eppendorf) bei 600 Upm und 80°C erwärmt. Anschließend konnte sich der Ansatz bei RT langsam abkühlen. Die Proteinlösung war dabei sowohl vor als auch nach dem Erwärmen klar. Diese konnte direkt für die Analyse mittels SEC und CD-Spektroskopie verwendet werden.

2.2.2.3 Blue-Native-PAGE (BN-PAGE)

Im Gegensatz zu den SDS-PAGE werden auf BN-PAGE Proteine nicht im denaturierten, sondern im nativen Zustand aufgetrennt. Komplexe oder Oligomere bleiben dabei erhalten. Dies gelingt dadurch, dass Coomassie Blue anstelle von SDS als Überträger der negativen Ladung auf die Proteine verwendet wird. Dies ist notwendig, damit sich die Proteine in einem geeigneten Puffersystem von der Kathode zur Anode bewegen. Der Farbstoff zerstört dabei im Gegensatz zu SDS nicht die inter- und intramolekularen Wechselwirkungen der Proteine. Die Blue-Native-PAGE wurden nach Niepmann & Zheng (2006) durchgeführt.

Die dafür benötigten Gele waren 1,5 mm dick und hatten 10 Taschen zum Probenauftrag, welche etwa 40 µl Probe fassen konnten. Zuvor wurden die Proben mit 5 x BN- Ladepuffer versetzt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Die Herstellung der 5-35 % BN-Gele erfolgte mit einem Gradientenformer nach Tab. 2.13. Die Größe der Poren im Gel wird dabei mit zunehmender Laufstrecke kleiner. D.h., kleinere Proteine können einen weiteren Weg zurücklegen, während größere Proteine bereits früher in den Poren stecken bleiben. Es handelt sich also bei dieser Auftrennung nach dem Prinzip des Molekularsiebes um eine Endpunktbestimmung, welche von der Größe aber auch der Form der Proteine abhängig ist.

	Trenngel	
	5 %	35 %
40% Acrylamidlg	0,625 ml	4,375 ml
Gelpuffer	4,330 ml	0,580 ml
10% APS	30 µl	30 µl
TEMED	15 ml	15 ml

Tab. 2.13: Pipettierschema für BN-PAGE

Die Auftrennung erfolgte in „Mini-Protean 3“ Elektrophoresekammern mit einem „PowerPac 200“ (beides BioRad) als Spannungsgeber kontinuierlich bei 100 V und 4°C. Dazu wurde die Anodenkammer mit BN-Anodenpuffer aufgefüllt, die Kathodenkammer mit BN-Kathodenpuffer (mit Coomassie Blue) hingegen nur bis unterhalb der Probenaschen. Nachdem die Proben aufgetragen waren, wurde die Kathodenkammer vollständig aufgefüllt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Proben nicht aus den Taschen gespült wurden.

Nachdem die BN-PAGE zwölf Stunden lief, wurde der Kathodenpuffer mit Coomassie Blue gegen ebensolchen ohne Farbstoff ausgetauscht. Auch der Anodenpuffer wurde erneuert. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn der Proteinlauf den stationären Zustand erreicht hatte und der ungefärbte Kathodenpuffer das nicht an Proteine gebundene Coomassie Blue aus dem Gel entfernt hatte. Alternativ konnte die Färbung und Entfärbung der BN-PAGE auch mit den dafür bei SDS-PAGE verwendeten Lösungen erfolgen. Die Gele quellen bedingt durch die starken Konzentrationsunterschiede (5-35 % Acrylamid) nach Entnahme aus der Elektrophoresekammer unterschiedlich stark auf. Die dadurch entstehenden Randeffekte wurden vermindert, indem die äußeren Probenaschen nicht beladen wurden.

2.2.2.4 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen wurden in Kooperation mit Dr. Christoph Gelhaus aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias Leippe vom Zoophysiologicalen Institut der Universität Kiel durchgeführt. Die Proteinlösungen oder Coomassie-gefärbten SDS-PAGE wurden dort für die Messung aufbereitet. Dazu wurden die Proben entsalzt, in einen sauren pH-Wert überführt und mit einer geeigneten Matrix vermischt. Auf eine Reduzierung und Alkylierung konnte aufgrund der Abwesenheit von Disulfidbrücken in den zu analysierenden Proteinen verzichtet werden. Anschließend erfolgte mit einem „Proteomics 4700 Analyzer“ MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer (Applied Biosystems, Foster City, USA) die Analyse. Die Massenspektrometrie wurde verwendet, um die Identität der hergestellten Proteine zu bestätigen.

2.2.2.5 Dynamische Lichtstreuung

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) wurde in Kooperation mit Dr. Jeroen R. Mesters vom Institut für Biochemie der Universitätsklinik Lübeck durchgeführt. Bei der DLS handelt es sich um eine Methode, bei der der hydrodynamische Radius bzw. die Größe eines Proteins oder Proteinkomplexes in Lösung annähernd bestimmt werden können. Grundlage der

Methode ist die Streuung von Laserlicht an den in der Lösung befindlichen Teilchen. Diese befinden sich aufgrund der Brownschen Molekularbewegung in ständiger Bewegung. Dadurch verändert sich auch die Streuung ständig und es kommt zu Interferenzen. Durch die Berechnung einer Autokorrelationsfunktion unter Berücksichtigung der Zeit lassen sich die spezifische Größen des vermessenen Proteins bestimmen. Die Messungen erfolgten in einem „Laser-SpectroScatter 201“ der Firma RiNA GmbH (Berlin) in einer 12 µl Küvette bei RT. Die Proteinlösungen wurden 10fach vermessen und über alle Messungen gemittelt.

2.2.2.6 NMR-Spektroskopie

Die Kernresonanzspektroskopie, auch NMR-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*) wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Joachim Grötzinger vom Biochemischen Institut der Universität Kiel und Heiko Käbner vom Forschungszentrum Borstel durchgeführt. Dazu wurde zunächst die N-terminal His-markierten *si*-Domäne von *KCNQ2* (*Q2pET30*) über Ni-Agarose aufgereinigt und gegen 10 mM Na₂HPO₄ pH11 dialysiert. Nach der SEC über eine Superdex 75-Säule (Amersham) wurden die aufkonzentrierten Tetramere über eine NAP-25 Säule (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) in 10 mM Na₂HPO₄ pH 11, 7 % D₂O und 0,05 % Natriumazid nach Angaben des Herstellers überführt. Die Endkonzentration betrug etwa 4,1 mg/ml. Dies entspricht rund 0,29 mM.

2.2.2.7 Kristallisation

Um die Struktur der *si*-Domäne von *KCNQ2* bestimmen zu können, wurden in Kooperation mit Dr. Alexey Rak vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund Versuche zur Kristallisation der vollständigen Wechselwirkungsdomäne durchgeführt. Dazu wurden die Tetramere der N-terminal His-markierten und der unmarkierten Domäne in 50 mM CAPS pH 11 stark aufkonzentriert. Die Proben hatten Endkonzentrationen von rund 25,6 mg/ml für *Q2pET30* und rund 82,5 mg/ml für *Q2oTpET30*. Die Proteine wurden von Dr. Rak mittels Robotertechnik verschiedenen hundert Kristallisationsversuchen unterzogen.

2.2.3 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

2.2.3.1 *in vitro* RNA-Synthese

Für die Expression von Kaliumkanälen in *Xenopus* Oozyten wurde RNA benötigt. Dazu wurde zunächst das kodierende pTLN-Plasmid mit dem Restriktionsenzym *KspAI* linearisiert (8 µg DNA, 4 µl Reaktionspuffer, 2 µl *KspAI* (10 U/µl), ad 40 µl dH₂O für 2 Stunden bei 37°C). Anschließend wurde der Ansatz unter RNase-freien Bedingungen mit dem „High Pure

PCR Product Purification Kit“ (Roche) aufgereinigt. Für die Synthese der cRNA wurden davon 3 µl als Matrize mit 5 µl dNTPs, 1 µl 10 x Puffer und 1 µl SP6 DNA-abhängiger RNA-Polymerase gemischt (mMessage mMachin SP6 Kit, Ambion). Die Reaktion lief für 2 Stunden bei 37°C ab. Dabei ermöglichte die Linearisierung des DNA-Stranges der RNA-Polymerase nach Translationsende einfach von diesem abzulaufen (*Run off*-Verfahren).

Die RNA wurde durch die Zugabe von 15 µl DEPC-H₂O und 12,5 µl LiCl-Lösung (ebenfalls aus dem Kit) und halbstündiger Inkubation bei -20°C gefällt. Das Pellet wurde durch 20 Minuten bei 4°C und 21.100 g gewonnen und mit 250 µl eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen. Nach weiteren 10 Minuten Zentrifugation wurde der Überstand erneut verworfen. Die im Pellet befindliche, gereinigte cRNA wurde bei 37°C getrocknet und anschließend in 13 µl DEPC-H₂O gelöst.

2.2.3.2 Kontrolle der RNA

Für die Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl RNA-Lösung mit 99 µl DEPC-H₂O verdünnt und bei 260 nm photometrisch vermessen. Die Konzentrationsbestimmung gibt dabei keine Auskunft über den Zustand der RNA. Um eine mögliche Hydrolyse mit kontaminierenden RNasen auszuschließen, wurden ebenfalls 1 µl RNA-Lösung in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Nach Detektion klar definierter Banden wurde die RNA auf 200 ng/µl verdünnt und in 3 µl Aliquots bei -20°C gelagert.

2.2.3.3 Präparation von *Xenopus* Oozyten

Zunächst wurde ein Krallenfrosch-Weibchen für etwa 10 Minuten in 0,24 % Tricain-Lösung gesetzt. Die Aufnahme dieses Betäubungsmittels erfolgte dabei über die Haut (Abb. 2.4 A). Die Narkose ließ sich durch vorsichtiges Auf-den-Rücken-Drehen des Tieres überprüfen. Wenn diese vollständig war, unterblieben die reflexartigen Bewegungen der Extremitäten.

Der betäubte Frosch konnte operiert werden. Dieser Vorgang erfolgt auf Eis, um die Narkosetiefe zu halten und um auftretende Blutungen zu verringern. Die Operation erfolgte mit sterilem OP-Besteck im Unterbauch. Mit dem ersten Schnitt wurde die Haut geöffnet und die darunter liegende Muskulatur sichtbar. Diese wurde ebenfalls durchtrennt, wobei besonderes Augenmerk darauf gelegt wurde, dass der Darm des Tieres nicht verletzt wurde. Unter der Muskulatur lag frei zugänglich das Ovarialsäckchen. Durch vorsichtiges Ziehen quoll dieser in der Regel heraus (Abb. 2.4 B).

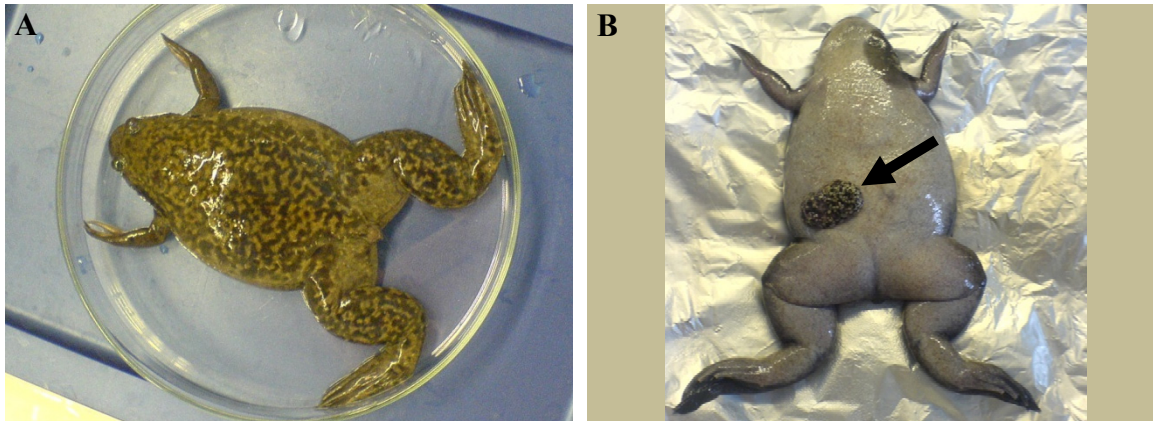


Abb. 2.4: Operation von *Xenopus laevis*

(A) Rückenansicht des Weibchens während der Betäubung mit Tricain-Lösung. Die Individuen wurden über ihre unterschiedliche Musterung identifiziert. (B) Bauchansicht während der Operation. Nach dem Durchschneiden der Haut und der Muskulatur in der Leistenengegend war ein Teil des Dottersackes (siehe Pfeil) leicht aus den Bauchraum zu entnehmen.

Je nach Bedarf wurde ein Teil des Dottersacks durch einen einfachen Schnitt abgesetzt und der Rest in den Bauchraum zurückgelegt. Anschließend wurden zuerst die Muskulatur und dann die Haut mit 2 bis 4 Stichen genäht. Dann wurde der Frosch unter fließendes Wasser gesetzt. In der Regel war nach einer halben Stunde das Betäubungsmittel, ebenfalls wieder über die Haut, entfernt. Das Tier wurde anschließend einen Tag in einem Quarantänebecken gehalten und dann wieder zu seinen Artgenossen gesetzt.

Die Oozyten aller Reifestadien sind von einer gallertartigen Hülle umgeben und über ein Netz von Blutgefäßen und Bindegewebssäden mit dem Dottersack verbunden. Um diese zu vereinzeln, wurde ein Verdau in 2 mg/ml Kollagenase in OR-2 -Lösung für etwa 2 Stunden bei RT und leichtem Schütteln (80 Upm) durchgeführt.

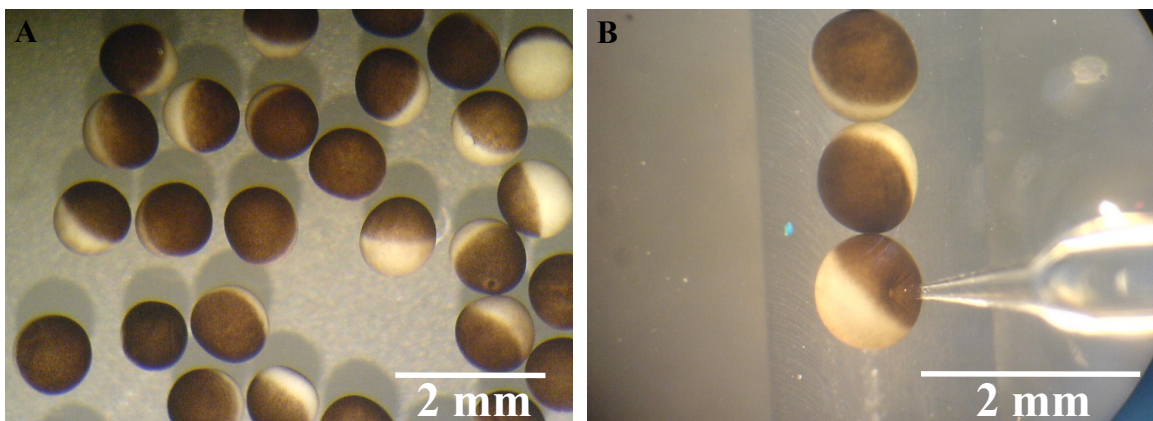


Abb. 2.5: Selektion und Injektion von Oozyten

(A) Ausgewählte Eizellen. Deutlich ist der dunklere, animale Pol vom helleren, vegetativen Pol abgesetzt. Die Oozyten drehen sich bevorzugt mit dem animalen Pol nach oben, bedingt durch die Anreicherung des schwereren Dotters am vegetativen Pol. (B) Injektion in eine Eizelle. Diese liegen in der Rille einer Plexiglasschale. Die Mikropipette ist in die unterste Oozyte eingestochen.

Anschließend wurden die Oozyten mit ND96-Lösung gewaschen, welche im Gegensatz zu OR-2-Lösung Ca^{2+} -Ionen enthält. Von den vereinzelt, unbefruchteten Eizellen wurden nun unter dem Binokular diejenigen im Reifestadium V und VI (nach Dumont, 1972) ohne äußerlich erkennbare Beschädigungen ausgewählt (Abb. 2.5 A). Diese kennzeichnen sich durch einen dunkleren, animalen Pol aus, der durch einen weißen Äquatorialstreifen von helleren, vegetativen Pol getrennt ist. Die Oozyten sind etwa 1-2 mm groß.

2.2.3.4 Injektion von cRNA in *Xenopus* Oozyten

In jede Oozyte wurden 50 nl RNA-Lösung über eine Mikropipette injiziert (Abb. 2.5 B). Für die Koexpression wurden die RNA-Lösungen vorher in einem sterilen Reaktionsgefäß gemischt. Dies erfolgte in der Regel im Konzentrationsverhältnis von 1:1. Anschließend wurden die Oozyten in mit ND96-Lösung gefüllten 96-Well-Mikrotiterplatten bei 17°C für drei Tage inkubiert.

2.2.3.5 Messung der Oozyten

Die Analyse der Expression von transient transfizierten Kaliumkanälen erfolgte durch die Messung von Strömen mittels der sogenannten Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (*two-electrode voltage clamp*). Durch das Einstechen einer Strom- und einer Spannungselektrode in die Oozyte wird die Gesamtheit der Ströme durch die Eioberfläche vermessen, wobei der technische Aufbau so angelegt ist, dass definierte Membranpotentiale an der Zelle fixiert werden können. Die durch die Kaliumkanäle verursachten Ströme, werden von der elektrischen Schaltung ausgeglichen und der dafür benötigte Ausgleichsstrom von der Stromelektrode zur Auswertung gemessen. Zum Vergleich wurden auch die elektrophysiologischen Eigenschaften nicht-transfizierter Oozyten aufgenommen.

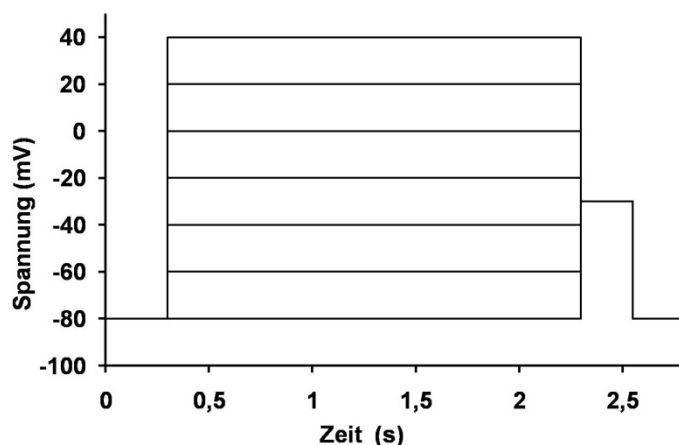


Abb. 2.6: Spannungsprotokoll der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Gezeigt sind die Spannungskurven der sieben aufeinander folgenden Messungen. Als erstes werden die Oozyten 300 ms bei einem Ruhepotential von -80 mV gehalten. Es folgt ein Schritt von 2 s bei jeweils unterschiedlichen Spannungen. Beginnend bei -80 mV steigt diese mit jeder Messung um 20 mV an, bis +40 mV erreicht werden. Bevor die Eizellen wieder auf das Ruhepotential gebracht werden, werden diese für 250 ms bei -30 mV gehalten.

Zunächst wurde die Oozyte für 300 ms bei einer Ruhespannung von -80 mV gehalten. Danach folgte ein 2 s langer Schritt auf ein variables Haltepotential. Dieses begann bei -80 mV und wurde bei jeder Messung um 20 mV erhöht, bis + 40 mV erreicht waren. Dadurch ergeben sich sieben Messkurven pro Oozyte. Nach diesem Schritt wurde die Spannung für 250 ms bei -30 mV gehalten (Abb. 2.6). Die in dieser Zeit gemessenen Ströme werden als *Tail*-Ströme bezeichnet. Die elektrophysiologischen Messungen ergaben somit zunächst Strom-Zeit-Kurven, aus welchen die Strom-Spannungskurven für das jeweilige Konstrukt ermittelt wurden. Danach wurden die Messungen auf den mittleren Strom des Wildtyp-Kanals bei +40 mV normiert. Dieses Vorgehen ermöglichte den Vergleich unterschiedlicher Oozyten-Präparationen miteinander. Der dafür verwendete Versuchsaufbau ist in Abb. 2.7 A zu erkennen. Er befindet sich, um äußere elektronische Einflüsse abzuschirmen, in einem Faraday-Käfig. Der angeschlossene Verstärker und Rechner befinden sich außerhalb.

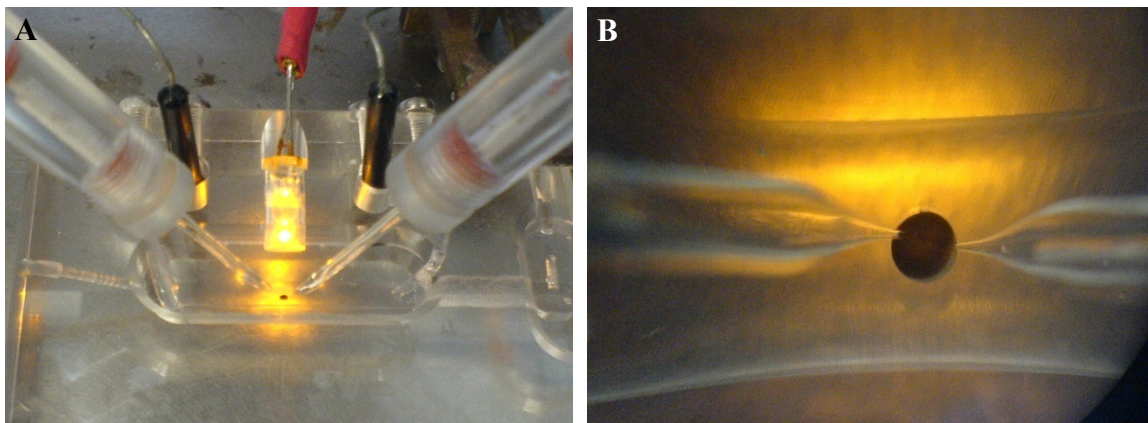


Abb. 2.7: Messung der Oozyten

(A) Versuchsaufbau der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme. Links im Bildvordergrund ist die Spannungselektrode, bestehend aus einem Halter mit gläserner Mikrokapillare, zu sehen. Sie ist mit 3 M KCl gefüllt und mit der Referenzelektrode (schwarz, im Hintergrund) verbunden. Auf der rechten Seite befindet sich der analoge Aufbau für die Stromelektrode. Die Referenzelektroden befinden sich in 3 M KCl, welche über eine Agarbrücke mit dem Pufferreservoir in der Mitte der Messanordnung verbunden sind. Diese bestehen aus gebogenen Glaskapillaren, die mit 2 % Agarosegel in 1 M KCl gefüllt sind. Die Oozyten werden zur Messung in eine Vertiefung im Pufferreservoir gelegt, welche von einer LED erleuchtet wird. Diese Diode gibt kaltes Licht ab, wodurch eine Erhitzung des Puffers und der Eizellen verhindert wird. (B) Oozyte mit eingestochener Spannungselektrode (links) und Stromelektrode (rechts).

Zuerst wurde die Spannungselektrode eingestochen und das Ruhepotential gemessen. Dieses war bei Oozyten, die Kaliumkanäle auf der Oberfläche aufwiesen deutlich in Richtung des K^+ -Ruhepotentials verschoben. Wenn Ströme messbar waren, wurden nur solche Oozyten vermessen, deren Ruhepotential unter -50 mV lag. Bei Zellen ohne oder mit sehr geringer Oberflächenexpression konnte dieser Grenzwert nicht angewendet werden. Als weiteres Kriterium diente der Ruhestrom, der nach dem Einstechen der Stromelektrode gemessen

wurde (Abb. 2.7 B). Idealerweise sollten im Ruhezustand bei injizierten und nicht- injizierten Oozyten nur geringe Ströme zu messen sein. Ein Leck in der Oberfläche, sei es durch Kultivierung oder Einstechen verursacht, machte sich in einem erhöhten Ruhestrom bemerkbar. Eizellen mit mehr als 0,1 μA Ruhestrom wurden als undicht angesehen und nicht verwendet.

2.2.3.6 Proteinpräparation aus Oozyten

Um die Herstellung von Proteinen in den elektrophysiologisch vermessenen Oozyten nachzuweisen, wurden deren Dotter mit Hilfe eines Western-Blots analysiert. Die Eizellen wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt und je Oozyte 10 μl PBS mit Complete Protease-Inhibitor zugegeben. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Pipettieren vorsichtig lysiert. Die Suspension wurde für 2 Minuten bei 400 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Der gereinigte Dotter wurde in soviel Puffer aufgenommen, dass sich wieder 10 μl pro Oozyte ergaben. Dann wurde das gleiche Volumen an reduzierendem 2 x Ladepuffer für SDS-PAGE zugegeben und die Probe für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Das Volumen von 20 μl entspricht dem Protein aus einer Eizelle.

2.2.4 Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid-System

Das *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid-System* (Stagljar *et al.*, 1998) ermöglicht durch eine Abwandlung des *Yeast Two-Hybrid-Systems* (Johnsson und Varshavsky, 1994) auch die Interaktion membranständiger Proteine *in situ* zu analysieren. Dabei wird das sogenannte *bait*-Protein, welches als Köder dient, mit dem künstlichen Transkriptionsfaktor LexA/VP16 und dem C-terminalen Teil des Ubiquitins (Cub) fusioniert (Abb. 2.8 A). Dieses kann mit einem *prey*-Protein, welches als Beute dient, interagieren. Dazu ist das *prey*-Protein mit einer mutierten N-terminalen Hälfte des Ubiquitins (NubG) verbunden (Abb. 2.8 B).

Eine Interaktion von *bait*- und *prey*-Proteinen bringt nun auch Cub und NubG in räumliche Nähe; sie können zu einem funktionsfähigen Split-Ubiquitin reassoziieren (Abb. 2.8 C). Normalerweise wäre die Interaktion dieser beiden Hälften aufgrund der Mutation im NubG alleine nicht möglich. Diese Veränderung verhindert gezielt, dass die beiden Ubiquitin-Hälften, unabhängig von einer Interaktion der zu untersuchenden Proteine, miteinander interagieren.

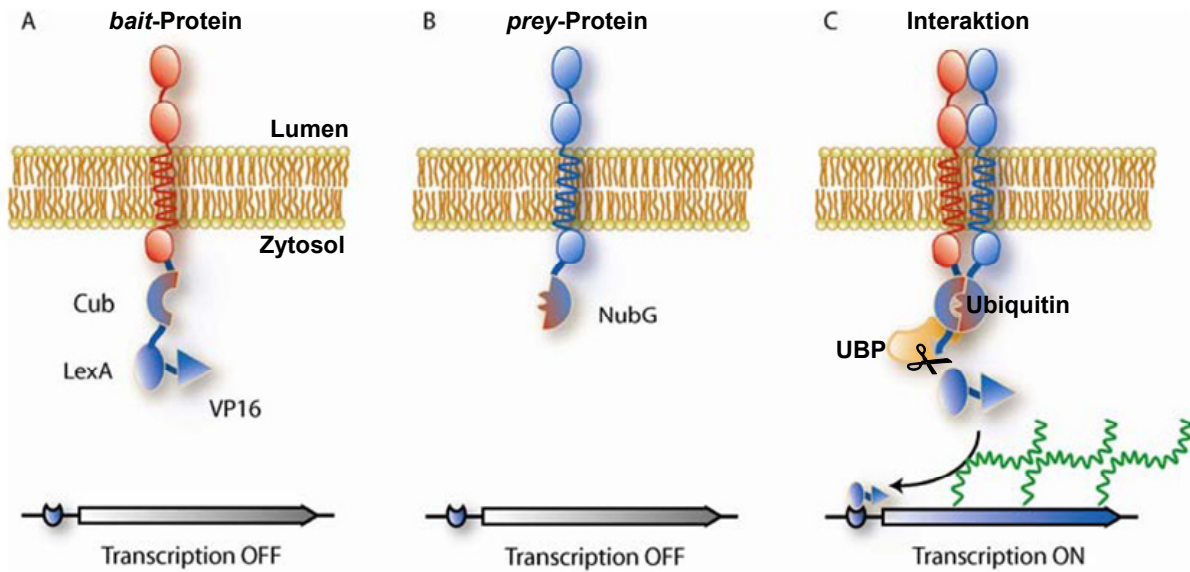


Abb. 2.8: Wirkungsweise des *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid-Systems*

(A) Prinzipeller Aufbau eines *bait*-Proteins. Das zu untersuchende Protein kann über seinen C- oder N-Terminus mit Cub und dem Transkriptionsfaktor, bestehend aus LexA und VP16, fusioniert sein. (B) Prinzipeller Aufbau eines *prey*-Proteins. Dieses kann über seinen C- oder N-Terminus mit NubG gekoppelt sein. Bei einer Interaktion der beiden Proteine kommt es zu Reassoziierung beider Hälften des Ubiquitins. Eine Ubiquitin-spezifische Protease (UBP) kann dann den Transkriptionsfaktor abspalten. Dieser aktiviert im Zellkern die Reportergene. Die Abbildung wurde entnommen und modifiziert nach dem Handbuch des Herstellers (MoBiTec).

Grundsätzlich ist es so, dass Proteine, die in der Zelle nicht mehr benötigt werden, vor ihrer Degradation durch das Anhängen von Ubiquitinresten unter ATP-Verbrauch für den Abbau markiert werden. Diese Bindung erfolgt normalerweise über C-terminale Aminosäurereste des Ubiquitins. Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBPs) sind im Gegensatz dazu in der Lage, Ubiquitin hinter dessen letzter C-terminaler Aminosäure vom modifizierten Protein wieder abzuspalten, um es so zu recyceln. Dieser Mechanismus wird im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid-System* dazu genutzt, bei einer Interaktion der zu untersuchenden Proteine den Transkriptionsfaktor hinter dem durch die Wechselwirkung entstandenen Split-Ubiquitin durch UBPs abzuspalten.

Der künstliche Transkriptionsfaktor ist löslich, gelangt in den Zellkern und aktiviert dort zwei Reportergene. Eine Umsetzung von X-Gal zu einem blauen Farbstoff weist die Aktivierung des *lacZ*-Gens nach. Außerdem wird das Wachstum auf Histidin-freiem Medium durch die Induktion der *His3*-Genexpression vermittelt. Der verwendete DSY-1 Hefestamm ist normalerweise dazu nicht in der Lage.

3 Ergebnisse

3.1 Sequenzanalyse der *si*-Domänen der KCNQ-Familie

Um die Bedeutung der *si*-Domänen für die Oligomerisierung der KCNQ-Kanäle zu untersuchen, wurden zunächst deren Proteinsequenzen *in silico* analysiert (Kap. 2.1.14), um dadurch Hinweise auf die zu erwartenden Strukturen zu erhalten. Der Sequenzvergleich und die Vorhersage der Sekundärstrukturen für den Bereich der *si*-Domäne zeigen große Ähnlichkeiten in den TCC-Domänen (Abb. 3.1). Der TCC1-Bereich umfasst 26 Aminosäuren, die Vorhersage für α -Helices (Kap. 2.1.14) unterscheidet sich dabei bei allen fünf Familienmitgliedern nur geringfügig. Diese ist dabei nicht durchgängig, sondern nach dem ersten Drittel unterbrochen. Die TCC2-Domäne besteht aus 33 Aminosäuren, wobei *KCNQ2* und *KCNQ4* die geringste Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von α -Helices haben, gefolgt von *KCNQ3* und *KCNQ5*. Bei *KCNQ1* ist die Wahrscheinlichkeit am höchsten.

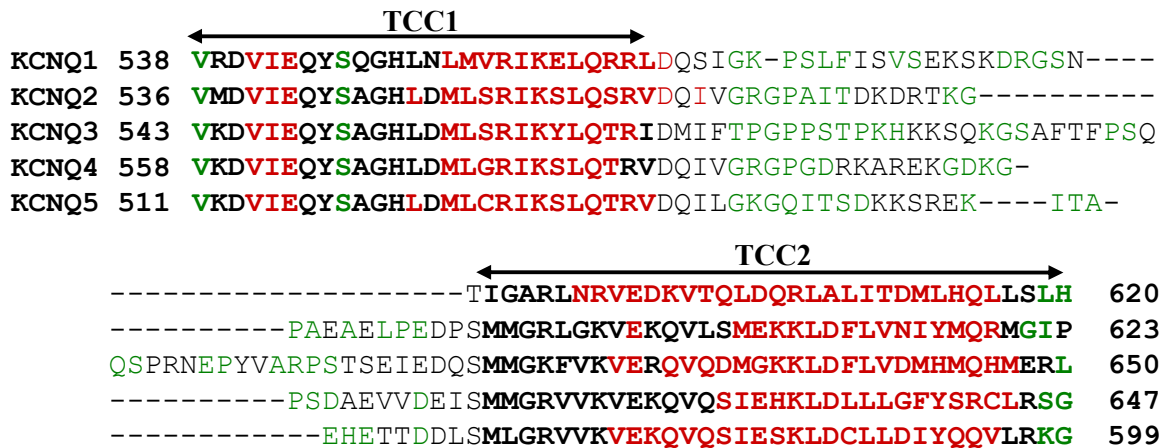


Abb. 3.1: Sekundärstrukturvorhersage für den Bereich der TCC-Domänen

Dargestellt sind die beiden TCC-Domänen (fett) und der dazwischenliegende Bereich. Für die rot dargestellten Aminosäuren wird eine α -Helix, für die grün dargestellten eine Schleife (*loop*) vorhergesagt.

Da 3,6 Aminosäuren zur Ausbildung einer Windung einer α -Helix benötigt werden (Löffler & Petrides, 2003), könnte die TCC1-Domäne maximal 7,2 Windungen, der TCC2-Bereich maximal 9,2 Windungen einer α -Helix ausbilden. Eine Übersicht über die vollständigen, in dieser Arbeit verwendeten Proteinsequenzen mit Nummerierung befindet sich in Anhang I. Dort sind auch alle Sequenzmotive eingezeichnet, die in dieser Arbeit berücksichtigt wurden.

Wie bereits beschrieben (Kap. 1.3.4), kann eine α -Helix eine *coiled-coil* Struktur ausbilden. Die Wahrscheinlichkeiten zur Ausbildung einer solchen unterscheiden sich deutlich zwischen den TCC-Bereichen der einzelnen Kanäle (Tab. 3.1). Die höchste Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer *coiled-coil* Struktur hat mit 0,988 die TCC1-Domäne von *KCNQ1*. Die Wahrscheinlichkeit der TCC1-Region von *KCNQ2* ist mit 0,369 erheblich geringer. Die

TCC1-Domäne von *KCNQ3* weist den geringsten Wert überhaupt auf, während die Wahrscheinlichkeiten des TCC1-Abschnitts von *KCNQ3* und *KCNQ4* dazwischen liegen. Diese haben allerdings die höchsten Wahrscheinlichkeiten für die TCC2-Domänen, gefolgt von der TCC2-Domäne von *KCNQ1*. Bis auf *KCNQ1* ist die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer *coiled-coil* Domäne bei den TCC2-Bereichen immer größer als bei der TCC1-Region.

Protein	<i>coiled-coil</i> Wahrscheinlichkeit	
	TCC1	TCC2
KCNQ1	0,988	0,827
KCNQ2	0,369	0,776
KCNQ3	0,024	0,592
KCNQ4	0,133	0,913
KCNQ5	0,159	0,943

Tab. 3.1: Maximale *coiled-coil* Wahrscheinlichkeiten der TCC-Domänen aller Wildtyp KCNQ-Kanäle
Es wurden dabei Fenster von jeweils 14 aufeinanderfolgenden Aminosäuren analysiert.

Die Sequenzanalyse der *si*-Domänen ergibt somit jeweils zwei Bereiche mit vermutlich α -helikaler Struktur, welche eine unterschiedliche Tendenz zur Ausbildung einer *coiled-coil* Struktur aufweisen.

3.2 Herstellung verschiedener Konstrukte der *si*-Domäne von *KCNQ2*

3.2.1 Klonierung

Die Hinweise auf die Ausbildung einer *coiled-coil* Struktur sollten an isolierten *si*-Domänen von *KCNQ2* überprüft werden. Zunächst wurde diese mit Hilfe des pET30a-Vektors in *E. coli* Rosetta exprimiert. Bei der Verwendung der *KpnI*- und der *XhoI*-Schnittstelle ergab sich ein Plasmid, das für die *si*-Domäne kodiert, welches mit einer N-terminalen Markierung (Abb. 3.2) von etwa 4,8 kDa fusioniert ist. Diese beinhaltet eine His₆-Sequenz, eine Thrombin-Schnittstelle, ein *S-Tag* und eine Enterokinase-Schnittstelle. Letztere ermöglicht die proteolytische Spaltung des Fusionsproteins.



Abb. 3.2: N-terminale Markierung der pET30-Konstrukte

Desweiteren wurde durch die Verwendung der *NdeI*- und *XhoI*-Schnittstellen eine isolierte *si*-Domäne ohne Markierung hergestellt (*Q2oTpET30*). Dadurch sollte ein potenzieller Einfluss der Markierung auf die Eigenschaften der *si*-Domäne überprüft bzw. ausgeschlossen werden.

Um die Bedeutung der einzelnen TCC-Domänen bei der Oligomerisierung zu untersuchen, sollte in weiteren Konstrukten die Ausbildung der Sekundärstruktur mit gezielten Mutationen verhindert werden: In *Q2-TCC1_{LzuP}* ist in der TCC1-Domäne ein Leucin an der d-Position 557 gegen ein helixbrechendes Prolin ausgetauscht worden (L557P, vgl. Anhang I). In *Q2-TCC2_{LzuP}* wurde die Ausbildung einer α -Helix im TCC2-Bereich ebenfalls gestört (L609P, vgl. Anhang I), allerdings wird deren *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit dadurch nicht vollständig aufgehoben. Das Konstrukt *Q2-TCC1+2_{LzuP}* enthält schließlich beide Mutationen. Bei allen bisher genannten Konstrukten wurde der Prolinrest 623 (vgl. Anhang I), welcher sich am unmittelbaren Ende der *si*-Domäne von *KCNQ2* befindet, nicht mit in das Protein einbezogen. Bedingt durch seine Lage könnte er eine destabilisierende Wirkung auf die TCC2-Region in der isolierten Domäne ausüben.

Abb. 3.3 gibt die Eigenschaften der verschiedenen *Q2pET30*-Konstrukte in der Übersicht wieder. Mit diesen sollten die umfangreichen strukturellen Untersuchungen der *si*-Domäne von *KCNQ2* durchgeführt werden.

A				B		
				<i>coiled-coil</i>		
				Wahrscheinlichkeit		
				TCC1	TCC2	
	Wildtyp		Mutation	Protein		
	TCC1	Schleife	TCC2	Q2oTpET30	0,369	0,776
His ₆	TCC1	Schleife	TCC2	Q2pET30	0,369	0,776
His ₆	TCC1	Schleife	TCC2	Q2-TCC1_{LzuP}	0,002	0,776
His ₆	TCC1	Schleife	TCC2	Q2-TCC2_{LzuP}	0,369	0,123
His ₆	TCC1	Schleife	TCC2	Q2-TCC1+2_{LzuP}	0,002	0,123

Abb. 3.3: Aufbau und *coiled-coil* Wahrscheinlichkeiten der verschiedenen *Q2pET30*-Konstrukte
 (A) Schematischer Aufbau. Die Abbildung ist nicht maßstabsgerecht. Die N-terminale Markierung ist stellvertretend mit His₆ gekennzeichnet. (B) Maximale *coiled-coil* Wahrscheinlichkeiten. Es wurden dabei Fenster von jeweils 14 aufeinanderfolgenden Aminosäuren analysiert. Wildtyp-Sequenzen sind grün, Mutationen grau gekennzeichnet.

3.2.2 Identitätsnachweis der verschiedenen *Q2pET30*-Konstrukte

Bei der Expression der verschiedenen *Q2pET30*-Konstrukte in *E. coli* entstand sowohl lösliches als auch unlösliches Protein in Form von Einschlusskörpern. Die Ausbeute an letzteren war mehrfach höher, so dass deren Aufreinigung und Renaturierung (Kap. 2.2.1.2) einfacher und ergiebiger war als die Gewinnung der löslichen Proteine. Die Identität der exprimierten Proteine konnte mittels Massenspektrometrie bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die dafür verwendeten Proben stammen aus Dialysen, welche auf einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden (Abb. 3.4). Diese zeigte darüber hinaus, dass die analysierten Lösungen sehr rein waren. Die Identität und die Reinheit der Proteine ermöglichte somit eine spezifische Analyse der *si*-Domäne von *KCNQ2*.

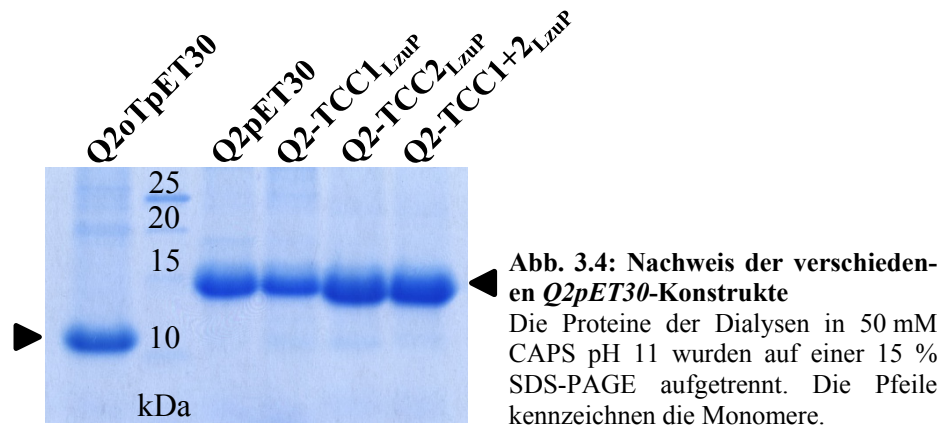


Abb. 3.4: Nachweis der verschiedenen *Q2pET30*-Konstrukte
Die Proteine der Dialysen in 50 mM CAPS pH 11 wurden auf einer 15 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die Pfeile kennzeichnen die Monomere.

3.3 Analyse der *si*-Domäne von *KCNQ2*

3.3.1 Löslichkeit und Renaturierung

Um zunächst einen geeigneten Puffer zur Charakterisierung der gewonnenen Proteine zu finden, wurde die vom pH-Wert und Salzkonzentration abhängige Renaturierung und Löslichkeit in verschiedenen Puffern untersucht. Dazu wurden zwei Verfahren angewendet: Die Renaturierung mittels Dialyse (Kap. 2.2.1.2.7) und das schnelle Verdünnen (Kap. 2.2.1.2.5). Letzteres konnte nur als hinweisgebender Vorversuch verwendet werden, ist aber wesentlich weniger zeitaufwendig und benötigt keine großen Mengen an Puffer. In der Dialyse wird im Gegensatz zum schnellen Verdünnen das zum Denaturieren der Einschlusskörper benötigte Guanidinhydrochlorid (Gu HCl) vollständig entfernt. Eine etwaige Erhöhung der Löslichkeit durch Gu HCl entfällt dadurch. Das schnelle Verdünnen stellte sich im Fall der vorliegenden Proteine als ausreichend heraus, um einen Hinweis auf geeignete Dialysebedingungen zu erhalten.

Bei der Renaturierung von *Q2pET30* führte die Anwesenheit von höheren Salzkonzentrationen zur Präzipitation des Proteins und damit zu geringer konzentrierten Proteinlösungen. Abb. 3.5 A zeigt dies stellvertretend für 50 mM Natriumacetat pH 5 mit und ohne 100 mM KCl.

Anschließend wurde die Löslichkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht. Abb. 3.5 B zeigt das Verhalten von *Q2oTpET30* in Puffern mit verschiedenen pH-Werten beim schnellen Verdünnen. Dabei scheinen die Proteinkonzentration und die Schärfe der Banden mit steigendem pH-Wert zuzunehmen. Bei pH 7,4, pH 8 oder pH 9 sind schwächere Banden zu sehen. Deren Intensität ist (proportional zur Konzentration) im sauren Bereich vergleichbar oder höher, die Banden aber diffuser. Dies könnte für eine durch geringe Konzentrationen an Gu HCl vermittelte Löslichkeit sprechen. Im stark Basischen zeigen sich klare Banden hoher Proteinkonzentration. Diese ist in 50 mM CAPS [3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure] pH 12 stärker als bei pH 11.

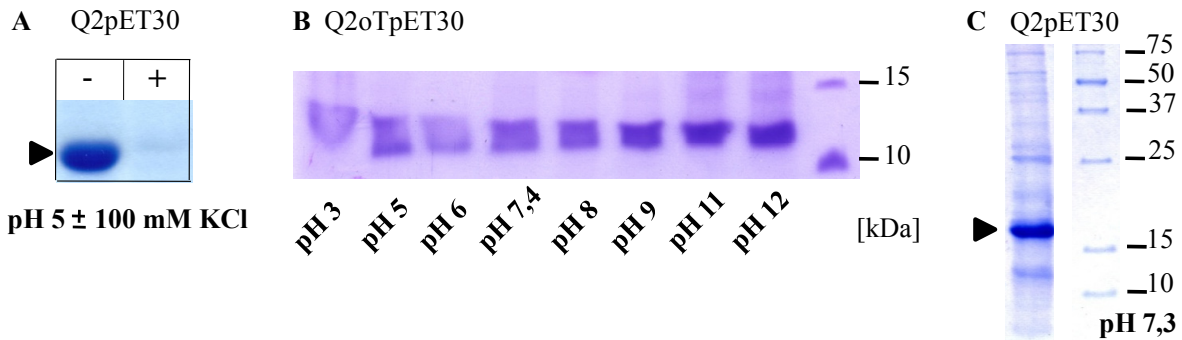


Abb. 3.5: Salz- und pH-abhängige Löslichkeit von *Q2pET30* und *Q2oTpET30*

(A) Dialyse des His₆-markierten *Q2pET30* aus Einschlusskörpern ohne Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose gegen 50 mM Natriumacetat pH 5 mit (+) und ohne (-) 100 mM KCl. Die Monomerbande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Das berechnete Molekulargewicht von *Q2pET30* beträgt 14,6 kDa. (B) Unmarkiertes *Q2oTpET30* aus Einschlusskörpern nach schnellem Verdünnen in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten. Als Puffer dienten 50 mM Natriumcitrat pH 3, 50 mM Natriumacetat pH 5, 50 mM Natriumphosphat pH 6, PBS pH 7,4, 50 mM Tris pH 8 und 9 sowie 50 mM CAPS pH 11 und 12. Das berechnete Molekulargewicht beträgt 9,9 kDa für *Q2oTpET30*. (C) Dialyse von *Q2pET30* aus Einschlusskörpern gegen 50 mM Na₂HPO₄ pH 7,3. Die Monomerbande von *Q2pET30* ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Alle Proben wurden auf einer 15 % SDS-PAGE aufgetrennt.

Bei der Dialyse der His₆-markierten *Q2pET30* Proteine gegen 50mM Na₂HPO₄ pH 7,3 (Abb. 3.5 C) zeigte sich, dass diese in diesem Puffer durchaus löslich sind. Da es sich dabei um eine unaufgereinigte Probe handelte, könnten auch unspezifisch in der Dialyse enthaltene Proteine die Löslichkeit von *Q2pET30* vermitteln. Deswegen wurden im Weiteren die His₆-markierten Proteine vor der Dialyse über Nickel-Agarose aufgereinigt (Kap. 2.2.1.2.6).

3.3.2 Aufreinigung der verschiedenen *KCNQ2* *si*-Domänen

Die Expression und Reinigung von Proteinen wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Abb. 3.6 zeigt stellvertretend die einzelnen Schritte der Gewinnung von der unmarkierten und der His₆-markierten *si*-Domäne von *KCNQ2*. Während die His₆-haltigen Proteine über Nickel-Agarose aufgereinigt werden konnten, wurden bei unmarkierten oder HA-markierten Konstrukten die Proteine ohne diesen zusätzlichen Reinigungsschritt direkt dialysiert. Die Aufreinigung der His₆-markierten Proteine über Nickel-Agarose führte zu einer höheren Reinheit im Vergleich mit den direkt dialysierten, wie die Abb. 3.6 verdeutlicht (vgl. „Ni“ und „Dial“).

Q2pET30 weist eine Doppelbande des Monomers auf (Abb. 3.6, Dreiecke). Diese können aus unterschiedlich denaturierten Faltungen des gleichen Proteins bestehen, welche aber bei dieser Auftragung nicht voneinander zu trennen sind. Überdies zeigte sich, dass die Banden des *Q2pET30* als auch *Q2oTpET30* bei höherem als dem errechneten Molekulargewicht auftraten. Die Verschiebung der Molekülgröße in der SDS-PAGE gegenüber dem eigentlichen Molekulargewicht ist ein immer wieder auftretender Effekt in der Proteinchemie (Rehm, 2002).

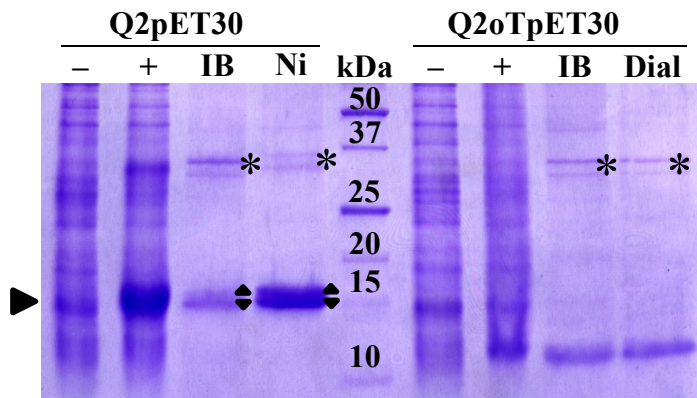


Abb. 3.6: Proteinexpression und Aufreinigung

Die 15 % SDS-PAGE zeigt verschiedene Stufen der Proteinherstellung. (-) Gesamtlisat der nicht-induzierten *E.coli* Rosetta. (+) Gesamtlisat nach Induktion mit IPTG für 3 Stunden. (IB) Protein aus Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) nach schnellem Verdünnen in 50 mM CAPS pH 11. (Ni) Dialysat des Nickel-Agarose-Eluats. (Dial) Dialysat der in 6 M Gua HCl, 50 mM Tris, pH 8 gelösten Einschlusskörper. Die Pfeile kennzeichnen die berechneten Molekulargewichte des Monomers von 14,6 kDa für *Q2pET30* und 9,9 kDa für *Q2oTpET30*, die Dreiecke die Doppelbanden des *Q2pET30* Monomers. Der Stern (*) kennzeichnet potenzielle Dimer-Banden.

Darüber hinaus gibt es weitere Banden bei höheren Molekulargewichten (Abb. 3.6, Stern), bei denen es sich um Dimere (ebenfalls als Doppelbande) handeln könnte. Allerdings unterscheiden sich die Positionen der Banden für die markierten und die nicht-markierten Konstrukte nur unwesentlich. Damit war die Expression und die Aufreinigung der Konstrukte erfolgreich.

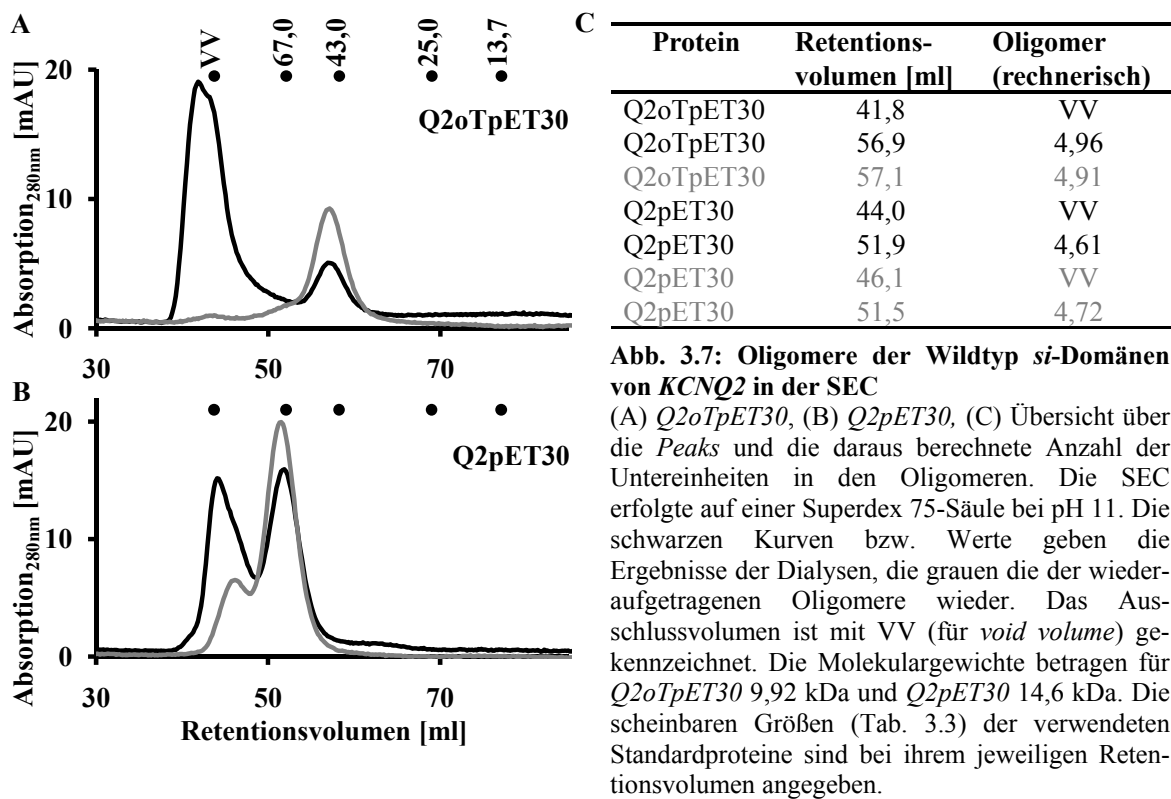
3.3.3 SEC der Wildtyp *si*-Domänen von *KCNQ2*

Um einen Einblick in die Quartärstruktur der aufgereinigten Wildtyp *si*-Domänen von *KCNQ2* in Form des markierten *Q2pET30* als auch des nicht markierten *Q2oTpET30* zu bekommen, wurden diese mittels SEC untersucht. Wie bereits erläutert (Kap. 2.2.2.1), werden in der SEC Proteine in Lösung nach ihrer nativen Größe aufgetrennt und können als Fraktionen gesammelt werden. Als *Peak* wird im Folgenden immer das UV-Signal bezeichnet, welches sich über mehrere Milliliter Retentionsvolumen (RV) hinzieht und von einer bestimmten Spezies an Protein (z.B. Dimere, Tetramere, Aggregate) verursacht wird.

Die Analyse der Wildtyp-Konstrukte der *si*-Domäne von *KCNQ2* erfolgte in 50 mM CAPS pH 11. Nach der beim schnellen Verdünnen gefundenen pH-Abhängigkeit (Kap. 3.3.1) wäre auch ein saurer pH-Wert zur Trennung denkbar. Dieser hätte auch eine Analyse mittels NMR-Spektroskopie ermöglicht. Allerdings blieben die Proteine der Dialyse gegen 50 mM Natriumacetat pH 5 unspezifisch und vollständig an die Superdex 75-Säule gebunden (nicht gezeigt). Dies könnte z.B. auf elektrostatische Effekte zurückzuführen sein. Die Trennung der Proteine der Dialyse bei PBS pH 7,4 war nicht möglich, da es in diesem Puffer aggregiert vorlag (nicht gezeigt). Daher wurde die SEC bei basischem pH-Wert durchgeführt.

Die Auftrennung der Proteinlösungen bei pH 11 ergab jeweils zwei Signale im Chromatogramm. Ein Proteinanteil befand sich im Ausschlussvolumen (VV, von *void volume*). Bei diesem handelt es sich um Proteine, die zu groß sind, um sie auf der verwendeten SEC-Säule aufzutrennen, oder um hochmolekulare Aggregate. Bei der Dialyse von *Q2oTpET30* (Abb. 3.7 A) ist der größte Teil des Proteins im Ausschlussvolumen zu finden. Da dieses Konstrukt keine His₆-Markierung besitzt, welche eine weitere Aufreinigung ermöglicht, ist dies erklärbar.

Der zweite, spezifische *Peak* hat ein Retentionsvolumen (RV) von etwa 56,9 ml. Dabei handelt es sich rein rechnerisch um ein Oligomer mit 4,96 Untereinheiten von *Q2oTpET30*. (Alle in dieser Doktorarbeit verwendeten Eichgeraden befinden sich in Anhang II.) Das Ergebnis der SEC suggeriert also zunächst das Vorliegen eines Pentameres.



Bei der SEC wird die native Größe des Proteins in Lösung inklusive seiner Hydrathülle bestimmt. Darüber hinaus unterscheiden sich die hydrodynamischen Eigenschaften der untersuchten Proteine von denen der Eichproteine. So ist Ovalbumins ellipsoid, während Albumin herzförmig ist und darüber hinaus von 17 Disulfidbrücken fixiert wird (Niepmann & Zheng, 2006). *Coiled-coil* Proteine sind hingegen aufgrund ihrer superspiralisierten Struktur häufig stäbchenförmig (Rose & Meier, 2004). Es sind also Proteine des gleichen Molekulargewichts nicht bei gleichen Retentionsvolumina zu erwarten, sofern sich ihre Form

unterscheidet. Diese hat damit einen entscheidenden Einfluss auf das Laufverhalten. Letztendlich ist eine Differenz zwischen der scheinbaren und der tatsächlichen Größe der Oligomere nicht nur erklärbar, sondern auch zu erwarten.

Der Anbieter des zur Erstellung einer Eichkurve verwendeten SEC Standard Kits „*Low Molecular Weight Calibration Kit*“ (Amersham Biosciences, UK) berücksichtigt diese Tatsache, indem er im Protokoll neben den tatsächlichen Molekulargewichten die scheinbaren Größen der Eichproteine angibt. Tab. 3.2 gibt einen Überblick über die dort auftretenden Unterschiede. Die Abweichungen zwischen dem scheinbaren und dem tatsächlichen Molekulargewicht betragen demnach von -13,9 % bis zu +18,4 %. Da nicht alle Eichproteine von diesem Anbieter bezogen wurden und damit die scheinbare Größe nicht für alle eingesetzten Eichproteine oder -moleküle verfügbar war, wurden die scheinbaren Molekulargewichte nur bei der Bestimmung der *si*-Domäne von *KCNQ2* auf einer Superdex 75-Säule verwendet.

Protein	Tatsächliches Molekulargewicht	Scheinbares Molekulargewicht	Differenz
Ribonuklease A	15,6 kDa	13,7 kDa	- 13,9 %
Chymotrypsinogen A	20,4 kDa	25,0 kDa	+ 18,4 %
Ovalbumin	49,1 kDa	43,0 kDa	- 14,2 %
Albumin	67,4 kDa	67,0 kDa	- 0,60 %

Tab. 3.2: Molekulargewichte der Eichproteine aus dem „*Low Molecular Weight Calibration Kit*“

Unter Berücksichtigung der physikalischen Effekte sowie der tetrameren Struktur anderer spannungsabhängiger Kaliumkanäle ist anzunehmen, dass es sich bei den in der SEC nachgewiesenen Spezies um *Q2oTpET30 Tetramere* handelt. In der Diskussion wird auf diese Zuordnung nochmals eingegangen.

Wie die unmarkierte *si*-Domäne bildet auch *Q2pET30 Tetramere* aus (Abb. 3.7 B). Die N-terminale Markierung der *si*-Domäne hat also keinen Einfluss auf die in der SEC sichtbare Oligomerisierung. Die Fraktionen der spezifischen Oligomere wurden aufkonzentriert und zur Überprüfung der Stabilität erneut auf die SEC-Säule aufgetragen (Abb. 3.7 A und B). Dabei erwiesen sie sich als überwiegend stabil. Nur die wieder aufgetragenen *Q2pET30 Tetramere* zeigen einen geringen Anteil an Protein im Ausschlussvolumen. Dieser könnte durch die Überschneidung der beiden *Peaks* in der SEC der Dialyse (Abb. 3.7 B) verursacht sein, so dass sich in den Fraktionen der Tetramere eine gewisse Menge an größeren Spezies befindet. Allerdings ist auch eine Aggregation durch die Aufkonzentrierung nicht auszuschließen. Abb. 3.7 C stellt diese Ergebnisse nochmals in einer Übersicht dar.

Die isolierte *si*-Domäne von *KCNQ2* kann sich also unabhängig von der N-terminalen Markierung oder vom restlichen Kaliumkanal falten und zu stabilen Tetrameren zusammenlagern.

3.3.4 CD-Spektroskopie der Wildtyp *si*-Domänen von *KCNQ2*

Ein potenzieller Einfluss der Markierung auf die Faltung der *si*-Domäne wurde mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht. Abb. 3.8 A gibt die Idealkurven dreier typischer Proteinfaltungen wieder. Eine α -Helix weist dabei die größten Amplituden auf. Deren Spektrum hat zwei Minima, das erste bei 208 nm und das zweite, schwächere bei etwa 222 nm. Der Schnittpunkt mit der Nulllinie liegt bei etwa 200 nm, bei kleineren Wellenlängen ist die molare Elliptizität positiv mit dem Maximum bei etwa 190 nm.

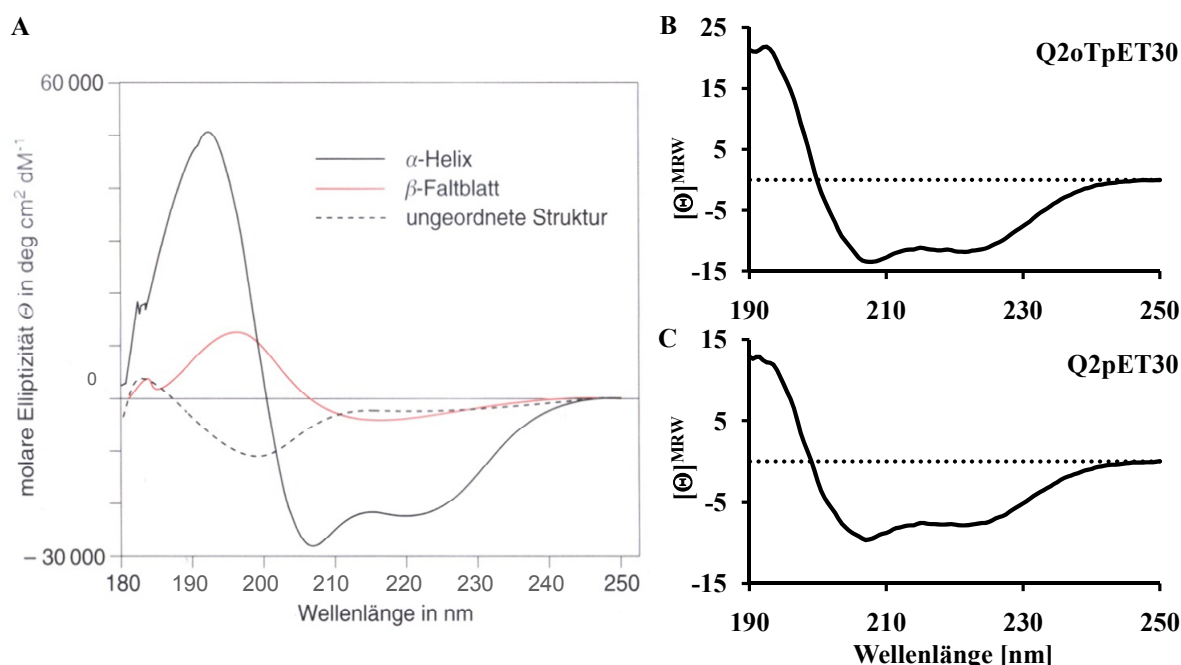


Abb. 3.8: Circular dichroismus-Spektren der Wildtyp *si*-Domänen von *KCNQ2*

(A) Die idealtypischen Spektren stammen von Peptiden (aus 15 Aminosäuren) mit typischer α -helikaler Konformation, β -Faltblattstruktur und ungeordneter Konformation. Die Abbildung wurde entnommen aus Lottspeich und Zorbas (1998). (B) und (C) CD-Spektren der Dialysen mit Nulllinie. Das Spektrum von *Q2oTpET30* weist eine andere Skalierung als das von *Q2pET30* auf. Die molare Elliptizität $[\Theta]_{\text{MRW}}$ ist gegeben in $[\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dM}^{-1}] \cdot 10^{-3}$.

Bei einer ungeordneten Struktur, wie sie z. B. durch die Einführung von Mutationen entstehen könnte, verschieben sich die charakteristischen Punkte zu kleineren Wellenlängen. Das erste Minimum tritt nun bei etwa 200 nm auf, das zweite Minimum wandelt sich in einen Wendepunkt. Der Schnittpunkt mit der Nulllinie erfolgt erst bei etwa 190 nm, also der Wellenlänge, bei der eine α -helikale Struktur ihr Maximum aufweist. Oberhalb von 190 nm verläuft das Spektrum im negativen Bereich. Insgesamt nimmt die Amplitude des Spektrums im Vergleich zu dem einer α -Helix ab.

Bei einem β -Faltblatt hingegen wird die Nulllinie bereits bei Wellenlängen größer als 205 nm geschnitten. Danach verläuft die Kurve im positiven Bereich mit einem Maximum zwischen 195 und 200 nm. Auch hier ist die Amplitude deutlich geringer als bei einer α -Helix.

Der Vergleich der Idealkurven mit den CD-Spektren der markierten und unmarkierten *si*-Domänen legt bereits eine überwiegend α -helikale Struktur nahe. Deren Messungen weisen unterschiedliche Amplituden auf, ähneln sich aber stark in ihrer Form (Abb. 3.8 B und C). Die Berechnung der Sekundärstrukturanteile ergab für *Q2oTpET30* mit 34,6 % α -Helices einen größeren Anteil gegenüber *Q2pET30* mit 27,1 % (Tab. 3.4). Sowohl im markierten, als auch dem nicht markierten Protein, bilden sich die gleichen Sekundärstrukturen in der *si*-Domäne aus. Allerdings verringert die 4,8 kDa große, ungeordnete Markierung allein aufgrund ihres Umfangs den Anteil gegenüber der 9,9 kDa *si*-Domäne, welcher überhaupt α -Helices ausbilden kann. Der α -helikale Anteil der Konstrukte entspricht etwa den vorhergesagten Werten (38,2 % für *Q2oTpET30*, 26,0 % für *Q2pET30*, Kap. 2.1.14). Die N-terminale Markierung übt also keinen Einfluss auf die Faltung der *si*-Domäne aus.

3.4 Analyse mutierter *si*-Domänen von *KCNQ2*

3.4.1 SEC mutierter *si*-Domänen von *KCNQ2*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Wildtyp *si*-Domäne von *KCNQ2* stabile Tetramere ausbildet, erfolgte die Analyse der mutierten Domänen (Abb. 3.9). Der schematische Aufbau der Proteine mit Leucin/Prolin-Veränderungen wurde bereits in Abb. 3.3 A dargestellt.

Dabei bildete *Q2-TCC1_{LzuP}*, mit zerstörter Sekundärstruktur der TCC1-Domäne ebenfalls Tetramere aus (Abb. 3.9 B). Die verbliebene Faltung ist offenbar ausreichend, um die Bildung eines stabilen Tetramers zu vermitteln. Dabei erscheint die beobachtete Größe des *Q2-TCC1_{LzuP} Tetramers* als 5,44mer größer als die des *Q2pET30 Tetramers* (4,61mer). Dies ist auf die Auflösung der Faltung der TCC1-Domäne und die damit einhergehende Vergrößerung des hydrodynamischen Radius zurückzuführen.

Die gestörte Ausbildung einer α -Helix in der TCC2-Domäne von *Q2-TCC2_{LzuP}* bildet im Gegensatz dazu nur noch Dimere aus (Abb. 3.9. C). Eine intakte TCC1-Domäne genügt also in *KCNQ2* nicht für eine Tetramerisierung der *si*-Domäne. Die gleichzeitige Mutation beider TCC-Strukturen in *Q2-TCC1+2_{LzuP}* führt nicht zur vollständigen Aufhebung der Oligomerisierung, da sich immer noch Dimere ausbilden (Abb. 3.9 D).

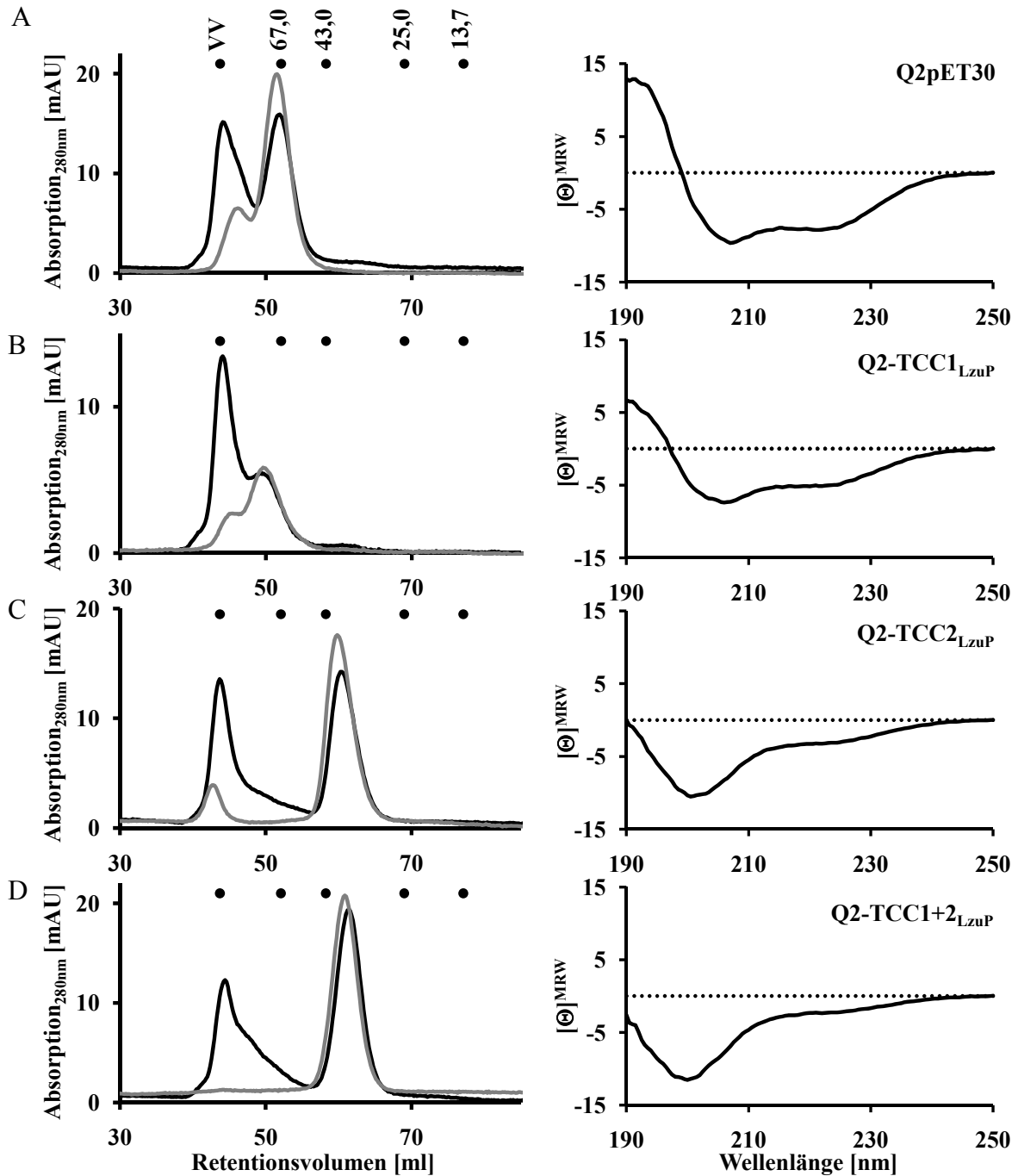


Abb. 3.9: Eigenschaften der markierten *Q2pET30*-Konstrukte in der SEC und CD-Spektroskopie

(A) *Q2pET30*, (B) *Q2-TCC1_{LzuP}*, (C) *Q2-TCC2_{LzuP}* und (D) *Q2-TCC1+2_{LzuP}*. Links: SEC auf einer Superdex 75-Säule bei pH 11. Die schwarzen Kurven zeigen die Chromatogramme der Dialysen, die grauen die der wiederaufgetragenen Oligomere. Das Ausschlussvolumen ist mit VV (für *void volume*) gekennzeichnet. Die Molekulargewichte betragen für (A), (B) und (C) 14,6 kDa, für (D) 14,5 kDa. Die scheinbaren Größen (vgl. Tab. 3.3) der verwendeten Standardproteine sind bei ihrem jeweiligen Retentionsvolumen angegeben. Rechts: CD-Spektren der Dialysen mit Nulllinie. Die Messungen des markierten Wildtyp-Proteins sind zum besseren Vergleich ebenfalls dargestellt. Die molare Elliptizität $[\Theta]^{MRW}$ ist gegeben in $[\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dM}^{-1}] \cdot 10^{-3}$.

Die aufkonzentrierten, spezifischen Oligomere der mutierten *si*-Domänen wurden zur Überprüfung ihrer Stabilität ebenfalls erneut aufgetragen (Abb. 3.9). Dabei erwiesen sie sich als überwiegend stabil.

Die Rechromatographie der *Q2-TCC1_{LzuP} Tetramere* wies wie die der *Q2pET30 Tetramere* einen geringen Anteil an Protein im Ausschlussvolumen auf (Abb. 3.9 B). Dies könnte durch die Überschneidung der beiden *Peaks* in der SEC der Dialyse oder eine Aggregation bei der Aufkonzentrierung verursacht sein. Bei den *Q2-TCC2_{LzuP} Dimeren* hingegen ist eindeutig eine schwache Aggregation erkennbar, denn bei der Auftrennung der Dialyse in die *Peaks* des Ausschlussvolumens und der Dimere überschneiden sich diese nicht (Abb. 3.9 C). Bei den *Q2-TCC1+2_{LzuP} Dimeren* sind hingegen in der Rechromatographie keine Aggregate zu erkennen (Abb. 3.9 D). Die Retentionsvolumina der Tetramere bzw. Dimere aus den Dialysen stimmen in allen Fällen gut mit denen der Rechromatographien überein (Tab. 3.3).

Protein	Retentionsvolumen [ml]	Oligomer (rechnerisch)	Zuordnung
Q2oTpET30	57,1	4,91	Tetramere
Q2pET30	51,5	4,72	Tetramere
Q2-TCC1 _{LzuP}	49,7	5,38	Tetramere
Q2-TCC2 _{LzuP}	59,8	2,86	Dimere
Q2-TCC1+2 _{LzuP}	60,8	2,67	Dimere

Tab. 3.3: Oligomere Eigenschaften der verschiedenen *Q2pET30*-Konstrukte

Die Retentionsvolumina und die Anzahl der Untereinheiten den Oligomeren beziehen sich auf die Rechromatographien.

Die Wildtyp *si*-Domäne bildet also Tetramere aus, welche auch bei der Auflösung der Sekundärstruktur in der TCC1-Domäne erhalten bleiben. Erst die Mutation des TCC2-Bereichs führt zur Ausbildung von Dimeren, sowohl bei *Q2-TCC2_{LzuP}* als auch *Q2-TCC1+2_{LzuP}*.

3.4.2 CD-Spektroskopie mutierter *si*-Domänen von *KCNQ2*

Bereits in der SEC zeigten die mutierten *si*-Domänen von *KCNQ2* Unterschiede gegenüber dem Wildtyp. Auch in der CD-Spektroskopie sind veränderte Eigenschaften durch die Einführung von Leucin/Prolin-Mutationen sichtbar. Diese verursachen erwartungsgemäß eine schrittweise Verringerung der α -Helikalität (Abb. 3.9 rechts, Tab. 3.4).

Protein	1. Minimum	2. Minimum	Schnittpunkt mit Nulllinie	α -Helikalität
Q2oTpET30	221,5	207,5	200	34,6 %
Q2pET30	221,5	207,0	199	27,1 %
Q2-TCC1 _{LzuP}	218,0	206,0	197	16,8 %
Q2-TCC2 _{LzuP}	200,5	---	190	10,2 %
Q2-TCC1+2 _{LzuP}	200,0	---	<190	7,3 %

Tab. 3.4: Charakteristika der CD-Spektren der unterschiedlichen *Q2pET30*-Konstrukte

Der Leucin/Prolin-Austausch in der TCC2-Domäne von *Q2-TCC2_{LzuP}* führt zu einer stärkeren Verringerung der α -Helikalität (um 16,9 %) gegenüber dem Wildtyp *Q2pET30* als die Störung des TCC1-Bereichs in *Q2-TCC1_{LzuP}* (Verlust von 10,3 %). Das zeigt, dass die TCC2-Region stärker zum Anteil der α -Helixes beiträgt als die TCC1-Domäne. Dies könnte von deren größeren Umfang abhängen, da die TCC2-Domäne mit 33 Aminosäuren größer als der TCC1-Bereich mit 28 Aminosäuren ist. Außerdem muss dabei berücksichtigt werden, dass die Mutation die *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit des TCC2-Bereichs nicht vollständig aufhebt (Abb. 3.3 B).

Die Doppelmutante *Q2-TCC1+2_{LzuP}* weist mit 7,3 % nur noch eine geringe α -Helikalität auf. Diese kann durch verbleibende Teilstrukturen verursacht sein. Die Spektren von *Q2-TCC2_{LzuP}* und *Q2-TCC1+2_{LzuP}* weisen außerdem kein zweites Minimum mehr auf. Zudem ist ihr erstes Minimum deutlich auf den für ungeordnete Strukturen typischen Wert von 200 nm verschoben. Die charakteristischen Messwerte sind in Tab.3.4 zusammengefasst. Sie belegen, dass die eingeführten Leucin/Prolin-Mutationen nicht nur die *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit erniedrigen, sondern auch die α -helikale Sekundärstruktur der TCC-Domänen stören.

3.4.3 SEC von C-terminal markierten *si*-Domänen von *KCNQ2*

Die bei den N-terminal markierten Konstrukten (Abb. 3.3) verwendete Markierung ist mit 4,8 kDa recht groß im Vergleich zur eigentlichen *si*-Domäne (9,9 kDa). Zwar hat sie in der SEC (Kap. 3.3.3) und der CD-Spektroskopie (Kap. 3.3.4) keinen Einfluss auf die Eigenschaften der *si*-Domäne, da sie aber am Synthesebeginn des Proteins liegt, stellt sie nicht sicher, dass nur vollständige *si*-Domänen aufgereinigt werden. Deswegen wurden Konstrukte hergestellt, welche lediglich eine His₆-Markierung an ihrem C-Terminus aufweisen.

Die Klonierung dieser Konstrukte (*Q2pET30-CHis*, *Q2-TCC1_{LzuP}-CHis*, *Q2-TCC2_{LzuP}-CHis* und *Q2-TCC1+2_{LzuP}-CHis*) erfolgte ebenfalls über die *Nde*I- und die *Xho*I-Schnittstellen. Dabei wurden die drei der *si*-Domäne folgenden Aminosäuren (PPT) mit in die Konstrukte einbezogen. Sie sollten als Verbindung zwischen einer potenziellen α -Helix und der His₆-Sequenz dienen.

Abb. 3.10 A zeigt stellvertretend den schematischen Aufbau der C-terminal markierten Konstrukte anhand des *Q2pET30-CHis*. Vor der Auftrennung der Dialysen durch SEC wurde deren Reinheit mittels SDS-PAGE überprüft (nicht gezeigt). Diese war mit der der N-terminal markierten Konstrukte (Abb. 3.4) vergleichbar.

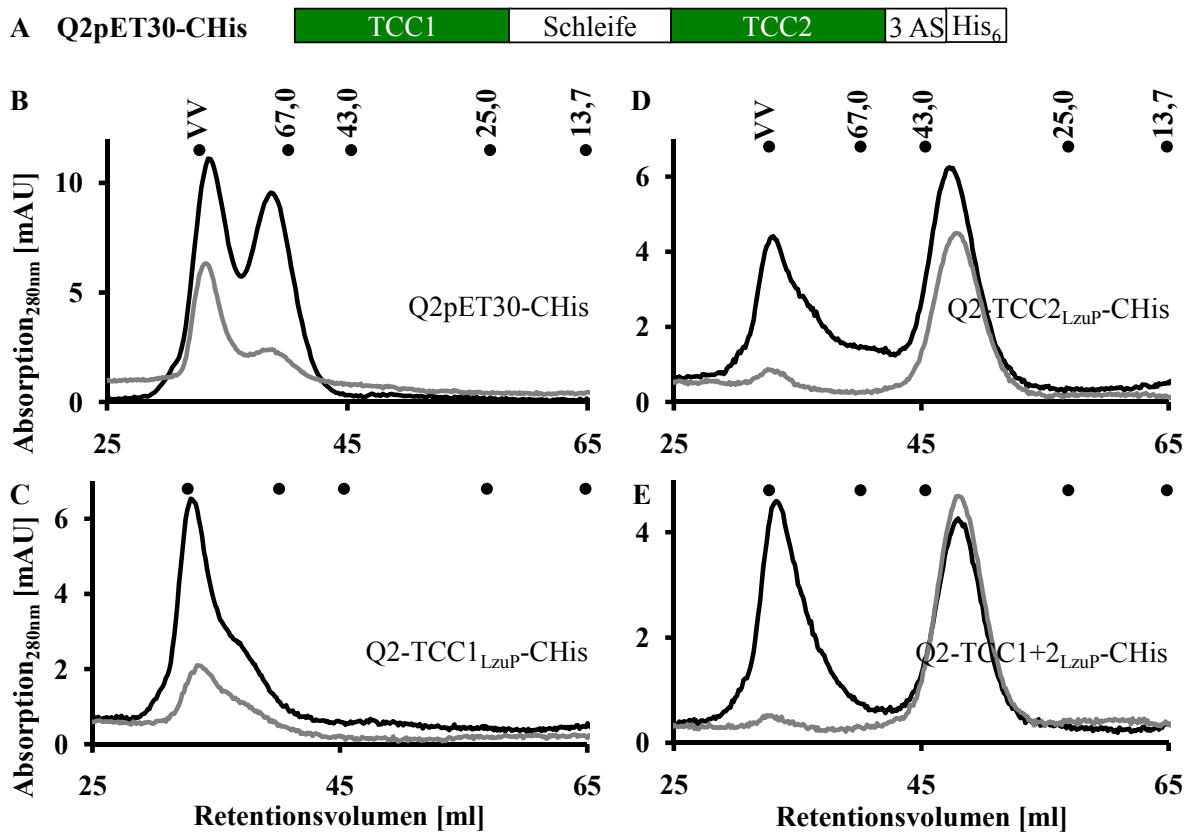


Abb. 3.10: C-terminal markierte *si*-Domänen von *KCNQ2*

(A) Schematischer Aufbau von $Q2pET30\text{-CHis}$, stellvertretend für die C-terminal markierten *KCNQ2*-Konstrukte. Der Leucin/Prolin-Austausch in den Mutanten erfolgte analog zu den in Abb. 3.3 dargestellten Konstrukten. Die Abbildung ist nicht maßstabsgerecht. Vor der His₆-Sequenz befinden sich noch drei der *si*-Domäne folgende Aminosäuren (3 AS). SEC von (B) $Q2pET30\text{-CHis}$, (C) $Q2\text{-TCC1}_{LzuP}\text{-CHis}$, (D) $Q2\text{-TCC2}_{LzuP}\text{-CHis}$, (E) $Q2\text{-TCC1+2}_{LzuP}\text{-CHis}$. Die Chromatogramme zeigen die Auftrennung auf einer Superdex 75-Säule bei pH 11. Die schwarzen Kurven geben die Dialysen, die grauen die der aufkonzentrierten Oligomeren wieder. Das Ausschlussvolumen ist mit VV gekennzeichnet. Die Molekulargewichte betragen alle etwa 11,0 kDa. Die scheinbaren Größen (vgl. Tab. 3.3) der verwendeten Standardproteine sind bei ihrem jeweiligen Retentionsvolumen angegeben.

Das Chromatogramm der $Q2pET30\text{-CHis}$ Dialyse (Abb. 3.10 B) zeigt wie das von $Q2pET30$ zwei *Peaks*: Neben dem Ausschlussvolumen liegen noch Tetramere in der Lösung vor. Diese erwiesen sich in der Rechromatographie als überwiegend instabil und bildeten Aggregate.

Bei $Q2\text{-TCC1}_{LzuP}\text{-CHis}$ (Abb. 3.10 C) ist im Chromatogramm bereits bei der Dialyse nur ein geringer Anteil an Tetrameren als Schulter nach dem Ausschlussvolumen erkennbar. Diese bilden beim Wiederauftrag einen mit dem der Dialyse vergleichbaren Anteil an Protein im Ausschlussvolumen und sind daher instabil.

Die $Q2\text{-TCC2}_{LzuP}\text{-CHis}$ (Abb. 3.10 D) und $Q2\text{-TCC1+2}_{LzuP}\text{-CHis}$ (Abb. 3.10 E) Dialysen zeigen ein, mit dem der N-terminal markierten Konstrukte, vergleichbares Verhalten. Sie bilden neben dem Ausschlussvolumen noch Dimere aus. Im Gegensatz zu den Tetrameren mit intakter TCC2-Domäne ($Q2pET30\text{-CHis}$ und $Q2\text{-TCC1}_{LzuP}\text{-CHis}$) sind sie auch nach der Aufkonzentrierung stabil.

Tab. 3.5 fasst die Ergebnisse der Rechromatographien der C-terminal markierten *si*-Domänen von *KCNQ2* nochmal zusammen. Im Vergleich mit den N-terminal markierten Konstrukten (Kap. 3.4.1) ergeben sich deutlich größere und instabilere Oligomere. Die vorgenommene Zuordnung als Tetramere und Dimere wird in der Diskussion noch weiter erläutert.

Protein	Retentionsvolumen [ml]	Oligomer (rechnerisch)	Zuordnung
Q2pET30-CHis	33,2	VV	Aggregate
Q2pET30-CHis	38,6	6,44	Tetramere
Q2-TCC1 _{LzuP} -CHis	33,4	VV	Aggregate
Q2-TCC2 _{LzuP} -CHis	47,8	3,66	Dimere
Q2-TCC1+2 _{LzuP} -CHis	48,0	3,62	Dimere

Tab. 3.5: Oligomere Eigenschaften der C-terminal markierten *si*-Domänen von *KCNQ2*

Die Retentionsvolumina und die Anzahl der Untereinheiten den Oligomeren beziehen sich auf die Rechromatographien. Das Ausschlussvolumen ist mit VV gekennzeichnet.

3.4.4 Blue-Native-PAGE

Um die in der SEC (Kap. 3.3.3 und 3.4.1) gefundene Oligomerität der verschiedenen *Q2pET30*-Konstrukte zu bestätigen, wurden diese Proteine mittels Blue-Native-PAGE (BN-PAGE, Kap. 2.2.2.3) untersucht. Dabei werden Proteine oder Proteinkomplexe nach ihrer nativen Größe in einem 5-35 % Gradientengel ohne SDS aufgetrennt und bleiben je nach Größe in den kleiner werdenden Poren des Gels stecken. Da der Nachweis der Proteine auf der Färbung im Acrylamidgel beruht, sind für diese Methode relativ große Mengen an konzentrierten Oligomeren nötig.

Versuche zur Erstellung einer Kalibrierungskurve verliefen wegen Mangels an geeigneten Standardproteinen unbefriedigend (nicht gezeigt). Die dafür in der SEC verwendeten Proteine ergaben teilweise diffuse bzw. mehrere Banden oder liefen nicht in die BN-PAGE ein. Theoretisch verhält sich der Retentionsfaktor der Proteinkomplexe sigmoidal zum Logarithmus des Molekulargewichts (Niepmann & Zheng, 2006). Auch die Form der Teilchen hat einen Einfluss auf die Auftrennung in der BN-PAGE, da diese die Porengröße beeinflusst, in der das Protein letztendlich stecken bleibt. Deswegen werden im Folgenden nur Ergebnisse der *Q2pET30*-Konstrukte im Verhältnis zueinander dargestellt.

Abb. 3.11 A zeigt die aufkonzentrierten, spezifischen Oligomere der unterschiedlichen *si*-Domänen von *KCNQ2*. In den ersten drei Bahnen wurden Tetramere der unmarkierten *Q2oTpET30* sowie der His₆-markierten *Q2pET30* und *Q2-TCC1_{LzuP}* aufgetrennt. Es ergeben sich jeweils zwei Banden, wobei die Proteine der kleineren, nicht markierten *si*-Domäne in der BN-PAGE eine weitere Laufstrecke zurückgelegt haben. Grundsätzlich entspricht das

obere Signal einem höheren Oligomer als das untere Signal. Die Auftrennung der *Q2-TCC2_{LzuP} Dimere* und *Q2-TCC1+2_{LzuP} Dimere* ergibt im Gegensatz dazu nur jeweils eine Bande. Diese liegt in etwa auf Höhe der unteren Bande von *Q2pET30* und *Q2-TCC1_{LzuP}*.

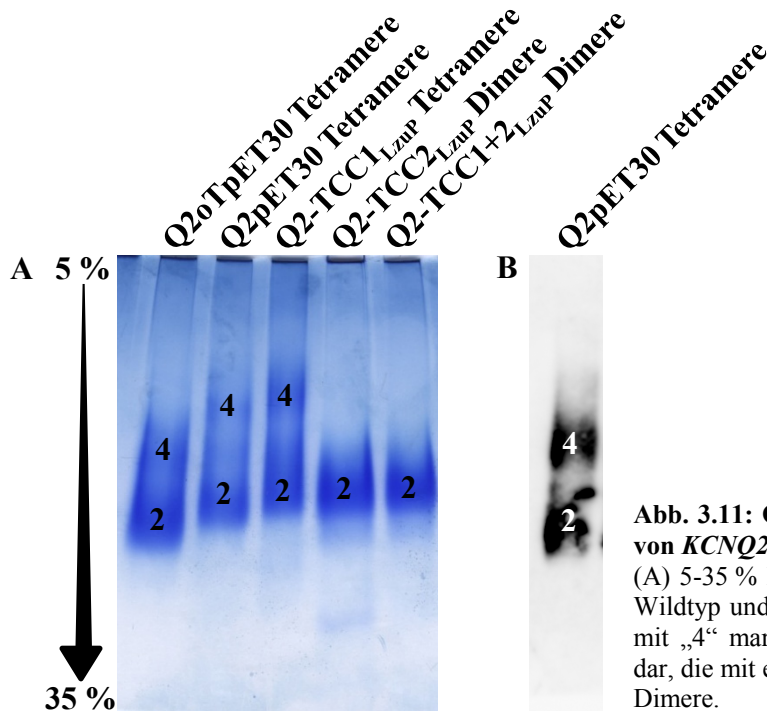


Abb. 3.11: Oligomerisierung der si-Domäne von *KCNQ2*
 (A) 5-35 % BN-PAGE mit Proteinbanden von Wildtyp und Mutanten. (B) Western-Blot. Die mit „4“ markierten Banden stellen Tetramere dar, die mit einer „2“ versehenen kennzeichnen Dimere.

Die einzelnen Banden von *Q2-TCC2_{LzuP}* und *Q2-TCC1+2_{LzuP}* enthalten Dimere. Die Signale auf gleicher Höhe bei den aufgetrennten Tetrameren von *Q2oTpET30*, *Q2pET30* und *Q2-TCC1_{LzuP}* geben ebenfalls dimere Spezies wieder. Diese könnten aufgrund der in der BN-PAGE auftretenden Scheerkräfte aus zerfallenden Tetrameren entstanden sein. Die oberen Banden stellen die Tetramere dar. Das *Q2oTpET30 Tetramer* (39,6 kDa M_w) liegt mit seiner Größe zwischen dem Dimer (29,2 kDa M_w) und dem Tetramer (58,4 kDa M_w) von *Q2pET30* und bestätigt so die vorgenommenen Zuordnungen der Oligomere.

Auch der Western-Blot (Abb. 3.11 B) gibt keinen Hinweis auf die Anwesenheit weiterer Spezies. Wenn es sich bei den Banden von *Q2-TCC2_{LzuP}* und *Q2-TCC1+2_{LzuP}* um Monomere handeln sollte, so müsste die Auflösung der Dimere zu hundert Prozent erfolgt sein. Dies ist unwahrscheinlich, zumal dann auch nur eine Bande bei den tetrameren Proben zu erwarten wäre. Insgesamt deutet also die Auftrennung der Oligomere der si-Domäne von *KCNQ2* in der Blue-Native-PAGE auf die gleiche Anzahl an Untereinheiten in den Oligomeren hin, wie in der SEC gefunden.

3.5 Weitere Eigenschaften der Wildtyp *si*-Domäne von *KCNQ2*

3.5.1 Strukturaufklärung

Um die tetramere Struktur der *si*-Domäne von *KCNQ2* in Lösung direkt zu bestätigen, sollte diese mittels NMR oder Röntgenstrukturanalyse untersucht werden. Die Aufkonzentrierung der späteren Fraktionen der *Q2pET30* und *Q2oTpET30 Tetramer-Peaks*, welche keinen Anteil von Proteinen des Ausschlussvolumens hatten, führten zur Gewinnung fast reiner Tetramerlösungen, welche für die weiteren Experimente verwendet werden konnten.

Zunächst wurden die *Q2pET30 Tetramere* in 10 mM Na₂HPO₄ pH 11, 7 % D₂O und 0,05 % Natriumazid NMR-spektroskopisch untersucht (Kap. 2.2.2.6). Grundsätzlich ist die Aufnahme von Spektren im sauren Milieu vorzuziehen, allerdings aggregierten die isolierten Tetramere bei sämtlichen Versuchen, diese in einen sauren Puffer zu überführen (nicht gezeigt). Weil CAPS-Puffer nicht in deuterierter Form erhältlich ist, wurde ein gering konzentrierter Phosphatpuffer mit pH 11 verwendet. Die erhaltenen Signale waren schwach und die Austauschrate so hoch, dass das Spektrum nicht auszuwerten war. Von weiteren Versuchen wurde deshalb Abstand genommen.

Stattdessen sollte die Anzahl der Untereinheiten mittels Röntgenstrukturanalyse ermittelt werden. Dies erfolgte in Kooperation mit Dr. Alexey Rak vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund (Kap. 2.2.2.7). Die dafür eingesetzten Proben hatten Endkonzentrationen von 25,6 mg/ml für *Q2pET30 Tetramere* und 82,5 mg/ml für *Q2oTpET30 Tetramere*. Trotz der eingesetzten reinen und hochkonzentrierten Proteinlösungen bildeten sich keine Kristalle der *si*-Domäne von *KCNQ2*. Eine direkte Strukturanalyse der tetrameren *si*-Domäne von *KCNQ2* war somit nicht möglich.

3.5.2 Dynamische Lichtstreuung

Da die direkte Bestimmung der Anzahl der Untereinheiten in den Oligomeren nicht möglich war, um die tetramere Struktur der *si*-Domäne von *KCNQ2* zu bestätigen, sollte die dynamische Lichtstreuung zur Ermittlung des hydrodynamischen Radius der Teilchen in Lösung verwendet werden. Grundlage dieser Methode ist die Streuung von Laserlicht an den in der Lösung befindlichen Spezies (Kap. 2.2.2.5). Die mittels SEC gewonnenen *Q2oTpET30* und *Q2pET30 Tetramere* wurden mit dieser Methode untersucht (Abb. 3.12).

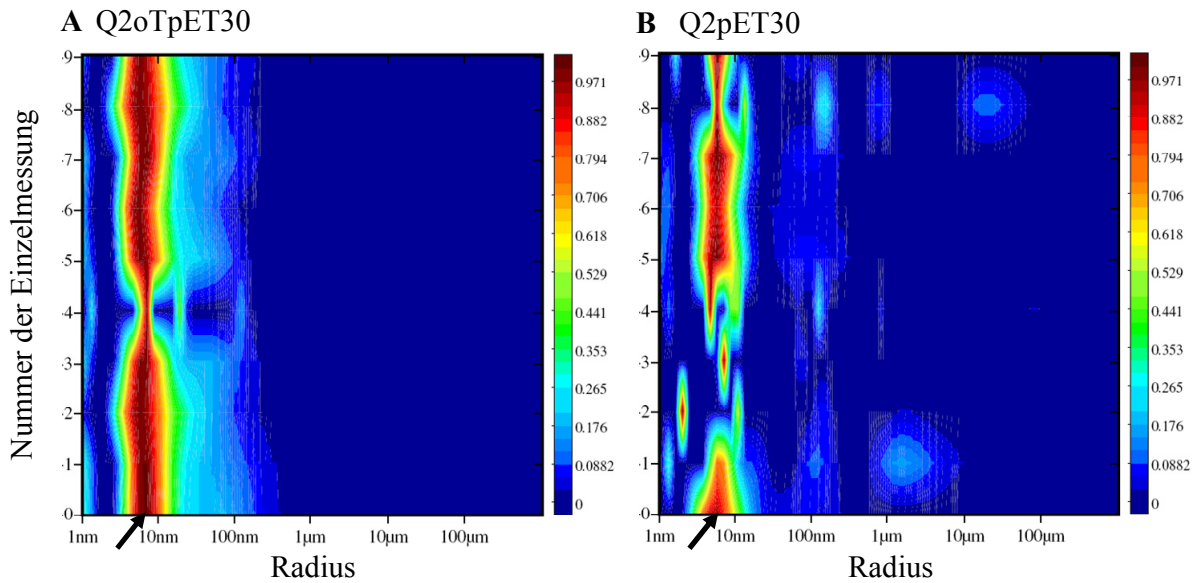


Abb. 3.12: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Dynamischen Lichtstreuung

(A) *Q2oTpET30 Tetramere*, (B) *Q2pET30 Tetramere*. Auf der X-Achse ist der Radius der gemessenen Teilchen in logarithmischer Skalierung angegeben. Die Wahrscheinlichkeit für die gefundene Größe ist auf der rechten Y-Achse in Farbkodierungen wiedergegeben. Von der blauen über die grüne Färbung nimmt der Anteil bis zum tiefroten Farbton zu. Die so dargestellten Größenverteilungen unterscheiden sich in den einzelnen durchgeführten Messungen. Auf der linken Y-Achse sind die jeweils 10 Einzelmessungen untereinander aufgeführt. Ein Messergebnis verläuft dabei als horizontaler Schnitt über die Abbildung. Die Flächen zwischen den einzelnen Messkurven sind dabei interpoliert. Die schwarzen Pfeile an der X-Achse kennzeichnen den mittleren hydrodynamischen Radius.

Auf den ersten Blick zeigt sich bei den *Q2oTpET30 Tetrameren* (Abb. 3.12 A) eine wesentlich homogenere Struktur als bei der markierten Variante. Nur bei Messung 4 gibt es neben der vorherrschenden Teilchengröße noch zwei geringere Anteile größerer Teilchen (größer 10 nm und größer 100 nm). Insgesamt ergibt sich ein gemittelter hydrodynamischer Radius von $6,34 \pm 0,39$ nm. Auffällig ist dabei, dass die Verteilung ein deutliches Vorkommen von Teilchen größer als die mittlere Größe aufweist, dieser Anteil aber mit steigendem Teilchenumfang kontinuierlich abnimmt. Erst bei etwa 100 nm wird der Nullwert erreicht. Da das erhaltene Signal relativ breit ist, scheint bei den *Q2oTpET30 Tetrameren* eine erhöhte strukturelle Flexibilität vorzuliegen.

Die einzelnen Messungen der *Q2pET30 Tetrameren* (Abb. 3.12 B) weisen offensichtlich eine größere Variabilität als die der unmarkierten Domäne auf. Deutlich zeigt sich bei den Messungen eine Tendenz zur Aggregation, welche in der Ausbildung heterogener Signale bei größeren Teilchengrößen deutlich wird. Der mittlere hydrodynamische Radius beträgt $6,7 \pm 1,6$ nm. Der Fehler ist dabei durch die ungleichen Einzelmessungen gegenüber den *Q2oTpET30 Tetrameren* stark vergrößert. Außerdem trägt die ungeordnete Markierung dieses Proteins zu seiner erhöhten Flexibilität bei.

3.5.3 pH-Abhängigkeit der *Q2oTpET30 Tetramere* und *Q2pET30 Tetramere*

Die Isolierung spezifischer Oligomere der *si*-Domäne von *KCNQ2* mittels SEC war nur im Basischen möglich (Kap. 3.3.3). Es ist nicht auszuschließen, dass sich die pH-Abhängigkeit der isolierten *Q2oTpET30 Tetrameren* von der, mittels schnellen Verdünnens bestimmten, pH-abhängigen Löslichkeit der *Q2oTpET30 Einschlusskörper* (Kap. 3.3.1) unterscheidet. Deswegen wurde eine aufkonzentrierte Lösung der *Q2oTpET30 Tetramere* mit einer Konzentration von 82,5 mg/ml zur systematischen Untersuchung mit Puffern verschiedener pH-Werte 1:100 schnell verdünnt und 1 Minute bei 21.100 g zentrifugiert. Dabei bildete sich kein sichtbarer Niederschlag. Die Proteinlösungen wurden dann mittels CD-Spektroskopie untersucht. Abb. 3.13 A zeigt die Spektren bei pH 5, PBS pH 7,4, pH 9 und pH 11.

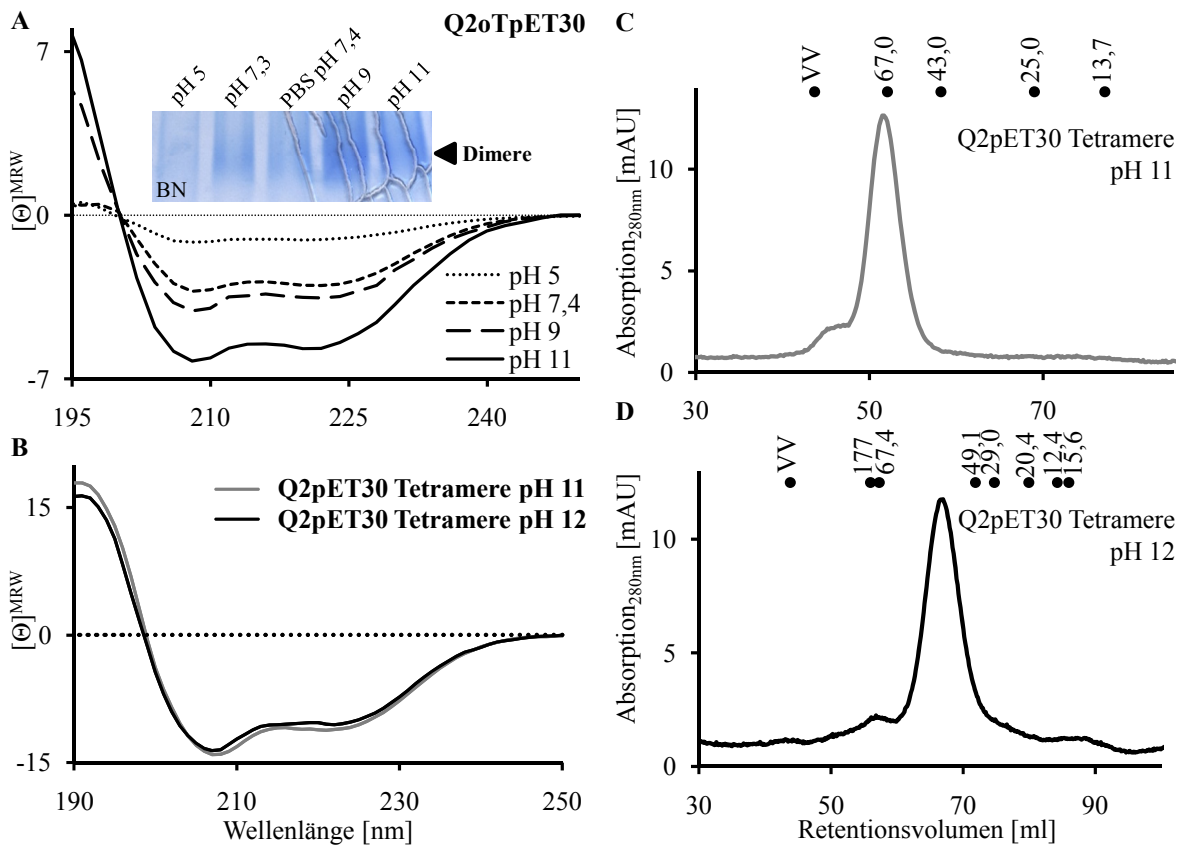


Abb. 3.13: pH-Abhängigkeit der Wildtyp *si*-Domäne von *KCNQ2*

(A) CD-Spektren schnell verdünnter *Q2oTpET30 Tetramere* in verschiedenen Puffern. Konzentrierte *Q2oTpET30 Tetramere* wurden 1:100 mit 50 mM Natriumacetat pH 5, 50 mM Natriumphosphat pH 7,3, PBS pH 7,4, 50 mM Tris HCl pH 9 oder 50 mM CAPS pH 11 schnell verdünnt. Einschub: Dimer-Bande einer 5-35 % BN-PAGE der in (A) vermessenen Proteinlösungen. Die Risse in der BN-PAGE sind Artefakte von der Trocknung des Geles. (B) CD-Spektren konzentrierter *Q2pET30 Tetrameren* in 50 mM CAPS pH 11 und pH 12. Die molare Elliptizität $[\Theta]_{MRW}$ ist gegeben in $[\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dM}^{-1}] \cdot 10^{-3}$. (C) SEC konzentrierter *Q2pET30 Tetrameren* auf einer Superdex 75-Säule in 50 mM CAPS pH 11 (51,5 ml RV; 4,72mer). Die scheinbaren Größen (vgl. Tab. 3.3) der verwendeten Standardproteine sind bei ihrem jeweiligen Retentionsvolumen angegeben. (D) SEC konzentrierter *Q2pET30 Tetrameren* auf einer Superdex 200-Säule in 50 mM CAPS pH 12 (66,8 ml RV; 3,94mer). Die Molekulargewichte der verwendeten Standardproteine sind bei ihrem jeweiligen Retentionsvolumen angegeben.

Diese Spektren weisen alle einen vergleichbaren Kurvenverlauf auf, allerdings mit steigenden Amplituden. Die Spektren treffen sich bei etwa 200 nm, was außerdem den Schnittpunkt mit der Nulllinie darstellt. Das erste Minimum liegt bei 208 nm, das zweite Minimum bei 220 nm (pH 5 und pH 11) bzw. 222 nm (pH 7,4 und pH 9).

Die aus diesen CD-Spektren berechnete α -Helikalität beträgt 7,8 % (pH 5), 11,5 % (PBS pH 7,4), 17,3 % (pH 9) bzw. 21,7 % (pH 11). Da der Schnittpunkt der Kurven auf der Nulllinie liegt, ist es denkbar, dass es sich bei den Spektren um Vielfache voneinander handelt. Dies könnte durch einen pH-abhängigen Effekt oder unterschiedliche Spezies des gleichen Proteins in den untersuchten Lösungen verursacht worden sein. Die Blue-Native-PAGE (Abb. 3.13 A, Einschub) zeigt, dass die Intensität der Dimer-Bande (stellvertretend für die Konzentration der löslichen Oligomere) bei steigendem pH-Wert und damit auch der steigenden Amplitude des Spektrums leicht zunimmt.

Unspezifische Aggregate, die durch die Überführung der Tetramere in Puffer mit ungünstigem pH-Wert entstanden sind, werden in der Blue-Native-PAGE nicht aufgetrennt. Gleichzeitig sind diese löslich, wie das Ausbleiben eines Niederschlages bei der Probenvorbereitung zeigt. Somit könnten sie über die von ihnen verursachte Streuung zu einer überhöhten Konzentrationsbestimmung führen und die erniedrigten Amplituden der CD-Spektren erklären, da die Konzentration in der Formel für die Normierung im Nenner steht (Kap. 2.2.2.2, Ggl. 6).

Q2oTpET30 und *Q2pET30* unterschieden sich nur in ihrer Markierung, welche keinen Einfluss auf die Faltung oder die Oligomerisierung bei pH 11 hat (Kap. 3.3.3 und 3.3.4). Daher ist davon auszugehen, dass auch *Q2pET30* eine pH-abhängige Speziesverteilung aufweist. Demnach müssten zwei Lösungen, welche die gleiche oligomere Zusammensetzung haben, auch gleiche CD-Spektren aufweisen. Um dies zu überprüfen, wurden *Q2pET30 Tetramere* von pH 11 mittels Dialyse in pH 12 überführt. Abb. 3.13 B zeigt, dass sich die CD-Spektren beider Proteinlösungen nur minimal in ihrer Amplitude, nicht aber in ihren Charakteristika unterscheiden. Die entsprechenden SEC zeigen, dass sowohl bei pH 11 (Abb. 3.13 C) als auch bei pH 12 (Abb. 3.13 D) bei gleicher Puffersubstanz (50 mM CAPS) fast ausschließlich Tetramere vorhanden sind. Diese Erhöhung des pH-Wertes hat damit die oligomeren Eigenschaften und das CD-Spektrum der *Q2pET30 Tetramere* nicht verändert.

Die Eichgerade der Superdex 200-Säule bei pH 12 weist zwei Besonderheiten auf: Die beiden kleinsten Eichproteine, Cytochrom c (12,4 kDa M_w) und Ribonuklease A (15,6 kDa M_w),

laufen nicht in der nach ihrem Molekulargewicht erwarteten Reihenfolge. Da die beiden Standardproteine getrennt aufgetragen wurden, ist deren Verwechslung ausgeschlossen. Außerdem zeigt auch Albumin (67,4 kDa M_w) bei pH 12 ein wesentlich geringeres Retentionsvolumen als nach dem Laufverhalten auf der Superdex 75-Säule bei pH 11 zu erwarten wäre.

Diese Auffälligkeiten könnten auf eine Denaturierung des Cytochrom c und des Albumins im stark Basischen zurückzuführen sein. Durch die Auflösung der Sekundärstruktur wird dabei deren hydrodynamischer Radius vergrößert. Im Gegensatz zu Cytochrom c und Albumin ist die bei pH 11 nachgewiesene Struktur der *Q2pET30 Tetramere* auch bei pH 12 stabil.

3.5.4 Crosslinking von *Q2pET30 Tetrameren*

Als weitere Möglichkeit, um die Anzahl der Untereinheiten der mittels SEC isolierten *Q2pET30 Tetramere* zu unterstützen, sollten diese in ihrem Proteinkomplex durch *Crosslinking*-Experimente bestimmt werden. Dabei werden die Untereinheiten chemisch miteinander verknüpft (Kap. 2.2.1.2.11).

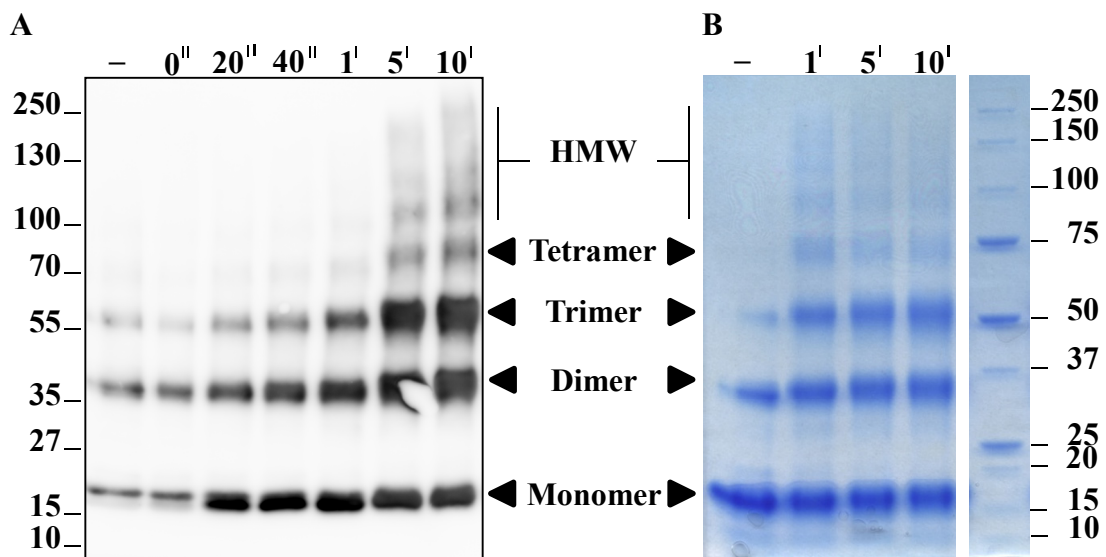


Abb. 3.14: Crosslinking von *Q2pET30 Tetrameren*

(A) Western-Blot der mit Sulfo-EGS verknüpften Untereinheiten, aufgetrennt auf einem 4-12 % Gradientengel. Es wurde ein α -His-Primärantikörper verwendet. (B) Coomassie-Färbung einer SDS-PAGE (4-12 %). Für diese Reaktion wurde die vierfache Proteinkonzentration eingesetzt. (-) Negativkontrolle, (0'', 20'', 40'', 1', 5', 10') Inkubationszeiten. Die Pfeile kennzeichnen die unterschiedlich großen Proteinkomplexe. Das berechnete Molekulargewicht des Monomers beträgt 14,6 kDa.

Bei der Negativkontrolle (erste Bahn) wurde statt des *Crosslinkers* Wasser eingesetzt (Abb. 3.14 A). Beim Nullwert (zweite Bahn) hingegen wurde die Lysin-Lösung zum Stoppen der Reaktion vor der Zugabe des Sulfo-EGS zugesetzt. Die Gleichartigkeit der Banden in diesen

beiden Proben zeigt, dass das Beenden der Reaktion mit Hilfe der Quenchlösung grundsätzlich funktioniert. Bei den weiteren Proben wurde die Reaktion nach 20 s, 40 s, 1 min, 5 min und 10 min beendet. Mit zunehmender Reaktionszeit wurden dabei die Dimer- und Trimerbanden wesentlich intensiver, auch die Tetramerbande wurde stärker.

Allerdings sind auch ohne *Crosslinking* beim Nullwert und der Negativkontrolle Banden mit höherem Molekulargewicht zu erkennen. Die Di- und Trimerbanden sind deutlich zu sehen, die Tetramerbande ist schwächer. Auch in der Coomassie-gefärbten SDS-PAGE sind vergleichbare Banden zu erkennen (Abb. 3.14 B). Da die *Q2pET30 Tetramere* von pH 11 mittels schnellen Verdünnens mit PBS pH 7,3 auf einen für die Reaktion optimalen pH-Wert gebracht wurden, ist deren teilweise Aggregation, wie bei den *Q2oTpET30 Tetrameren* (Kap. 3.5.3) dargestellt, anzunehmen. Dies erklärt das Auftreten von Banden mit höherem Molekulargewicht im Nullwert und der Negativkontrolle.

Am deutlichsten lässt sich nach 10 min das Muster von Proteinbanden erkennen. Die unterste Bande entspricht dem *Q2pET30 Monomer*, dessen Molekulargewicht 14,6 kDa beträgt. Wie bereits bei der Proteinaufreinigung beschrieben (Abb. 3.6), erscheint die Monomerbande als Doppelbande. Die nächstgrößeren Banden entsprechen der chemischen Addition von jeweils einem weiteren Monomer. Mit zunehmender Proteingröße werden die Signale unscharf und enden in einem hochmolekularen Aggregat. Dabei handelt es sich entweder um inter- statt intratetrameren Reaktionsprodukte oder um unspezifische Nebenprodukte der Reaktion.

Aufgrund der geringeren Sensitivität gegenüber dem Western-Blot (Abb. 3.14 A) wurde beim direkten Nachweis der Reaktionsprodukte mittels Coomassie-Färbung (Abb. 3.14 B) die vierfache Proteinmenge eingesetzt. Bei beiden angewendeten Nachweisen wurde aber für alle Reaktionszeiten die jeweils gleiche Proteinmenge eingesetzt. Dennoch scheint die Gesamtintensität der Signale im Western-Blot mit zunehmender Reaktionszeit insgesamt zuzunehmen. Der Versuch wurde mehrfach wiederholt, wobei stets dasselbe Phänomen auftrat. Dieses Verhalten wird vermutlich durch die Verfestigung unterschiedlicher Faltungen der Oligomere durch das *Crosslinking* verursacht und führt daher im Western-Blot zu einer größeren Fläche, welche mit dem Antikörper reagieren kann.

Das klare Bandenmuster spricht aber insgesamt für eine spezifische Ausbildung von Oligomeren durch das Protein. Eine Festlegung auf eine tetramere Struktur der *si*-Domäne von *KCNQ2* kann jedoch aufgrund der *Crosslinking*-Experimente nicht erfolgen.

3.5.5 Temperaturverhalten von *Q2pET30 Tetrameren*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der pH-Wert einen Einfluss auf die Oligomerität der *si*-Domäne ausübt (Kap. 3.3.3 und Kap. 3.5.3), sollte untersucht werden inwieweit die Temperatur deren Eigenschaften beeinflusst. Die CD-Spektren der *si*-Domänen von *KCNQ2* in CAPS-Puffer bei pH 11 weisen α -helikale Anteile auf, welche etwa denen der Sekundärstrukturvorhersagen entsprechen (Kap. 3.3.4). Die Bestätigung der α -Helices als vorherrschendes Strukturelement beweist aber noch nicht die ebenfalls vorhergesagte *coiled-coil* Struktur (Kap. 3.1).

Ein charakteristisches Merkmal einer *coiled-coil* Struktur kann die langsame, stufenlose Denaturierung der Faltung sein. Dabei ergibt sich ein über ein großes Temperaturintervall hinziehender Schmelzbereich, wobei die Renaturierung nach dem Erwärmen reversibel sein kann (Jenke *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Wiener *et al.*, 2008).

Die Denaturierung lässt sich unter anderem durch die Veränderung der optischen Eigenschaften bei 222 nm beobachten. Da α -Helices im Gegensatz zu ungeordneten Strukturen bei dieser Wellenlänge im CD-Spektrum eine große molare Elliptizität aufweisen (Abb. 3.8 A), kann eine Denaturierung durch eine Abnahme des Signals verfolgt werden.

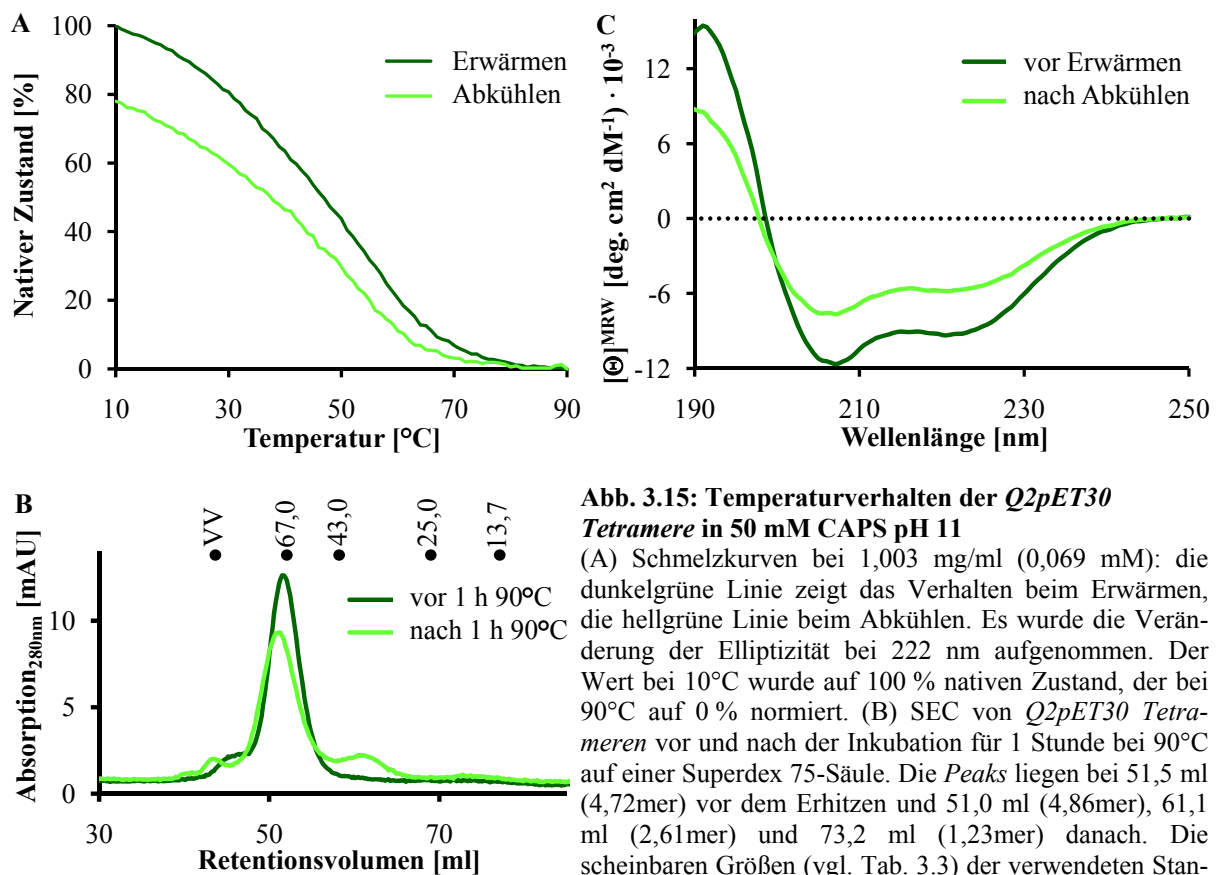


Abb. 3.15: Temperaturverhalten der *Q2pET30 Tetramere* in 50 mM CAPS pH 11

(A) Schmelzkurven bei 1,003 mg/ml (0,069 mM): die dunkelgrüne Linie zeigt das Verhalten beim Erwärmen, die hellgrüne Linie beim Abkühlen. Es wurde die Veränderung der Elliptizität bei 222 nm aufgenommen. Der Wert bei 10°C wurde auf 100 % nativen Zustand, der bei 90°C auf 0 % normiert. (B) SEC von *Q2pET30 Tetrameren* vor und nach der Inkubation für 1 Stunde bei 90°C auf einer Superdex 75-Säule. Die *Peaks* liegen bei 51,5 ml (4,72mer) vor dem Erhitzen und 51,0 ml (4,86mer), 61,1 ml (2,61mer) und 73,2 ml (1,23mer) danach. Die scheinbaren Größen (vgl. Tab. 3.3) der verwendeten Standardproteine sind bei ihrem jeweiligen Retentionsvolumen angegeben. (C) CD-Spektren von *Q2pET30 Tetrameren* vor und nach der Temperaturkurve aus (A).

Abb. 3.15 A zeigt die Schmelzkurve (Kap. 2.2.2.2) von *Q2pET30 Tetrameren*. Die maximale Elliptizität der Messung bei 10°C wurde gleich 100 %, die minimale Elliptizität bei 90°C gleich 0 % nativem Zustand gesetzt. Bei einer sprunghaften Veränderung würde der Wendepunkt der Kurve den Schmelzpunkt des Proteins darstellen.

Die *Q2pET30 Tetramere* beginnen bereits vor Raumtemperatur ihre räumliche Struktur aufzulösen. Zu Beginn erfolgt deren Denaturierung langsam und nimmt mit der Zeit zu. Dabei ist die negative Steigung ein Maß dafür, wie viel Protein je Grad Celsius seine Struktur verändert. Vor der vollständigen Denaturierung bei etwa 70°C nimmt diese wieder ab. Die reverse Temperaturmessung zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf, erreicht aber nach Abkühlung der Lösung nur 77,9 % des nativen Zustandes. Daher liegt bei den *Q2pET30 Tetrameren* offensichtlich eine *coiled-coil* Struktur vor, welche zum Großteil reversibel denaturiert werden kann.

Um zu überprüfen inwieweit die Erwärmung einen Einfluss auf die Oligomerität hat, wurden 1,8 ml einer etwa 1 mg/ml Lösung für 1 Stunde bei 90°C erwärmt, bei Raumtemperatur abgekühlt und mittels SEC analysiert. Abb. 3.15 B gibt die Chromatogramme der *Q2pET30 Tetrameren* vor und nach dem Erwärmen wieder. Dabei unterscheiden sich die beiden Proteinlösungen nur gering in ihrer Zusammensetzung. Nach der Renaturierung treten neben den vorherrschenden Tetrameren allerdings noch Anteile kleinerer Spezies, mutmaßlich Dimere und Monomere auf. Auch thermische Zerfallsprodukte des Proteins können nicht ausgeschlossen werden.

Die durch das Erwärmen verursachte, irreversible Denaturierung betrifft also nur einen kleinen Teil der eingesetzten Tetramere und führt dabei in der SEC zur Ausbildung kleinerer Oligomere. Der mittels SEC bzw. Temperaturkurve gefundene Anteil an renaturierten *Q2pET30 Tetrameren* stimmt nahezu überein.

Von der für die Messung der Schmelzkurve eingesetzten Probe wurden vor dem Erwärmen und nach dem Abkühlen CD-Spektren aufgenommen (Abb. 3.15 C). Beide Spektren stimmen in den Charakteristika ihres Verlaufs überein, allerdings nicht in ihrer Amplitude. Die Multiplikation des Spektrums nach dem Erwärmen mit dem Faktor 1,52 führt zum Erhalt fast identischer Spektren. Ihr Schnittpunkt liegt dabei nahe der Nulllinie, wobei der Durchgang durch diese vor dem Erwärmen zwischen 198,5 und 199 nm, nach dem Erwärmen zwischen 198 und 197,5 nm erfolgt. Die Erhitzung der Probe hat durch das Verdampfen von Wasser deren Proteinkonzentration geringfügig erhöht; dieser Unterschied wurde allerdings durch die

Normierung der Spektren kompensiert. Die Amplitudenunterschiede könnten daher durch die veränderte Oligomerenzusammensetzung in der Lösung oder, wie bei der pH-Abhängigkeit der *Q2oTpET30 Tetrameren*, von einer durch Aggregate verfälschten Konzentrationsbestimmung verursacht sein.

3.5.6 Einfluss der Calmodulin-Bindestellen auf die *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3*

Calmodulin stellt einen möglichen Interaktionspartner der KCNQ-Kanäle dar (Kap. 1.3.1). Welchen Einfluss dessen Bindung auf die Oligomerisierung des C-Terminus von *KCNQ2* und *KCNQ3* ausübt, ist noch nicht beschrieben. Da ein Großteil der Untersuchungen der isolierten *si*-Domänen bei stark basischem pH-Wert erfolgte, sollte durch die Erweiterung des Proteins um die N-terminal der *si*-Domäne befindlichen Calmodulin-Bindestellen geprüft werden, ob sich die daraus resultierenden Proteine näher an physiologischen Bedingungen untersuchen ließen.

Die Konstrukte, welche die beiden vor den *si*-Domänen befindlichen putativen Calmodulin-Bindestellen mit einschlossen (vgl. Anhang I), wurden sowohl C-terminal His₆-markiert (*Q2 Cal sid CHis* und *Q3 Cal sid CHis*) als auch ohne Markierung (*Q2 Cal sid oT* und *Q3 Cal sid oT*) hergestellt (Abb. 3.16). Die *KCNQ3*-Konstrukte sind dabei kleiner als die entsprechenden Proteine von *KCNQ2*, weil die Calmodulin-Bindestellen hier näher an der *si*-Domäne liegen.

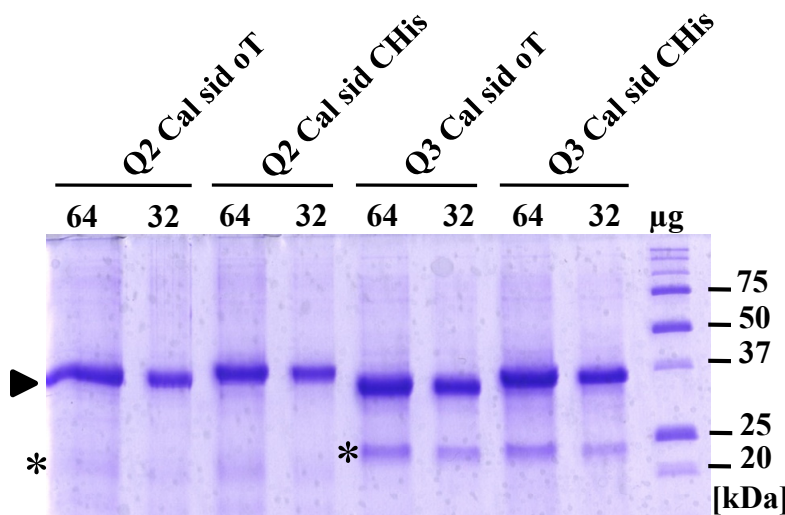


Abb. 3.16: Kontrolle der Calmodulin-Konstrukte

Die Proben entstanden durch schnelles Verdünnen von Einschlusskörpern in 50 mM CAPS pH 11. Es sind jeweils zwei unterschiedliche Proteinmengen auf einer 15 % SDS-PAGE aufgetragen worden. Die erwarteten Größen betragen für *Q2 Cal sid oT* 37,3 kDa, für *Q2 Cal sid CHis* 38,4 kDa, für *Q3 Cal sid oT* 34,2 kDa und für *Q3 Cal sid CHis* 35,4 kDa. Dies entspricht den dominanten Banden um die 37 kDa, welche durch einen Pfeil gekennzeichnet sind. Kleinere Proteinbanden sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Bei *Q3 Cal sid oT* und *Q3 Cal sid CHis* tritt neben der eigentlichen Proteinbande eine kleinere, schwächere Proteinbande bei etwa 25 kDa auf (Abb. 3.16, Stern). Bei *Q2 Cal sid oT* und *Q2 Cal sid CHis* ist ebenfalls um die 20 kDa eine allerdings noch schwächere Bande zu erkennen. Ob es sich dabei um Abbruchprodukte oder weitere in den Einschlusskörpern befindliche Proteine (Kap. 2.2.1.2.1) handelt, ist unklar.

Alle Proteine wurden mit Hilfe des schnellen Verdünnens auf ihre grobe pH-abhängige Löslichkeit überprüft. Diese wiesen eine Ähnlichkeit mit den Eigenschaften der isolierten *si*-Domänen auf. Die Proteinkonzentration war im sauren und basischen Bereich am stärksten. Die unmarkierten Konstrukte wiesen im Gegensatz zu den markierten aber auch bei neutralem pH eine geringe Löslichkeit auf (Daten nicht gezeigt).

Zunächst wurden die unmarkierten *Q2 Cal sid oT* und *Q3 Cal sid oT* gegen PBS pH 7,4 und 50 mM CAPS pH 12 dialysiert und mittels CD-Spektroskopie (Abb. 3.17) analysiert. Die gemessenen Spektren zeigen eine Faltung, welche bei pH 12 deutlich α -helikal geprägt ist. Die Amplitude der Spektren von *Q3 Cal sid oT* ist bei beiden Puffern größer als bei *Q2 Cal sid oT* und schneidet die Nulllinie bei größeren Wellenlängen. Somit scheint *Q3 Cal sid oT* den größeren Anteil an α -Helices in seiner Sekundärstruktur zu beeinhalteten. Allerdings ist bei beiden Proteinen in PBS pH 7,4 eine deutlich verringerte Amplitude und ein Verschieben des Spektrums zu ungeordneteren Strukturen zu beobachten. Dies spricht für einen höheren Anteil an ungeordneten Strukturen.

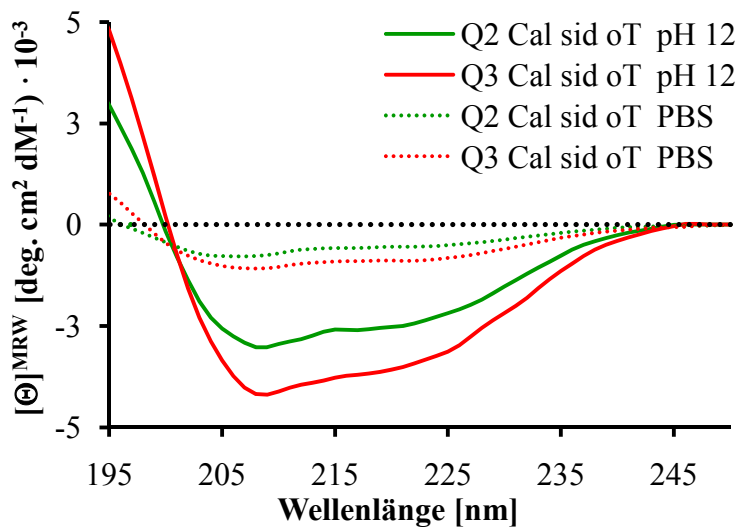


Abb. 3.17: CD-Spektren verschiedener Konstrukte mit Calmodulin-Bindestellen

Q2 Cal sid oT ist grün, *Q3 Cal sid oT* rot gekennzeichnet. Die Dialysen gegen 50mM CAPS pH12 sind durchgängig, die gegen PBS pH 7,4 gestrichelt dargestellt. Der Schnittpunkt aller Messungen bei etwa 201 nm entspricht dem isosbestischen Punkt.

Im Übrigen treffen sich alle Messungen bei etwa 201 nm, wobei der Schnittpunkt nicht auf der Nulllinie liegt. Vielmehr entspricht dieser dem isosbestischen Punkt und beschreibt diejenige Wellenlänge, bei welcher sich die Lichtabsorption im Laufe einer Reaktion nicht verändert (Hesse *et al.*, 1995). Somit scheint sich die Faltung der Konstrukte pH-abhängig zu verändern, wobei die Proteine weiterhin aggregiert sind.

In der SEC in PBS pH 7,4 banden alle vier Konstrukte mit Calmodulin-Bindestellen unspezifisch an eine Superdex 200-Säule (nicht gezeigt). Bei der Auftrennung der vier Proteine in 50 mM CAPS pH 12 liefen alle im Ausschlußvolumen (nicht gezeigt). Die Dialyse von

Q2 Cal sid oT und *Q3 Cal sid oT* gegen 50 mM Natriumcitrat-Puffer pH 3,0 zeigten in der SEC ebenfalls nur Protein im Ausschlussvolumen (nicht gezeigt). Eine Auftrennung in spezifische Oligomere war somit nicht möglich.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die in der CD-Spektroskopie nachgewiesene Faltung nicht zwischen Aggregaten oder Oligomeren unterscheidet. Die eigentliche Untersuchung der hergestellten Konstrukte zusammen mit Calmodulin steht dabei noch aus. Dabei ist es fraglich, ob eine Interaktion zwischen diesen die Aggregation der Proteine aufheben kann.

3.6 Herstellung verschiedener Konstrukte der *si*-Domäne von *KCNQ3*

3.6.1 Klonierung

Da sich die Homo- und Heteromerisierungseigenschaften von *KCNQ2* und *KCNQ3* unterscheiden, sollten auch die Eigenschaften der isolierten *si*-Domäne von *KCNQ3* untersucht werden. Analog zur Klonierung der *si*-Domäne von *KCNQ2* (Kap. 3.2.1) wurden *KCNQ3*-Konstrukte hergestellt. Diese beinhalten ebenfalls eine nicht markierte *si*-Domäne in *Q3oTpET30*, Einfachmutanten in Form von *Q3-TCC1_{LzuP}* und *Q3-TCC2_{LzuP}* sowie eine Doppelmutante als *Q3-TCC1+2_{LzuP}*. Abb. 3.18 gibt den schematischen Aufbau und die *coiled-coil* Wahrscheinlichkeiten für die verschiedenen *Q3pET30*-Konstrukte wieder.

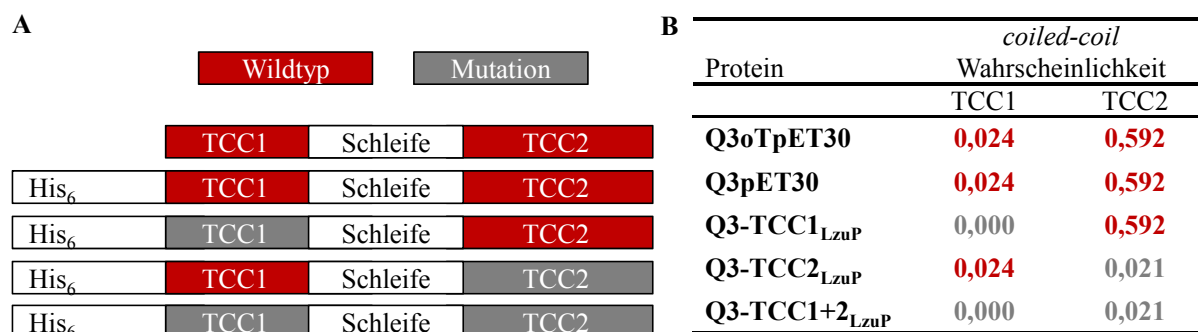


Abb. 3.18: Aufbau und *coiled-coil* Wahrscheinlichkeiten der verschiedenen *Q3pET30*-Konstrukte
 (A) Schematischer Aufbau. Die Abbildung ist nicht maßstabsgerecht. Die N-terminale Markierung ist stellvertretend mit His₆ gekennzeichnet. (B) Maximale *coiled-coil* Wahrscheinlichkeiten. Es wurden dabei Fenster von jeweils 14 aufeinanderfolgenden Aminosäuren analysiert. Wildtyp-Sequenzen sind rot, Mutationen grau gekennzeichnet.

TCC1-Domäne von *KCNQ3* weist die geringste *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit aller TCC-Domänen aller KCNQ-Kanäle auf (Kap. 3.1). Durch die Einführung einer Leucin/Prolin-Mutation an Position 564 wird diese völlig aufgehoben. Auch die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer *coiled-coil* Struktur in der TCC2-Domäne ist geringer als bei den anderen Kaliumkanälen dieser Familie. Der L636P-Austausch in diesem Bereich führt zu einer mit 2,1 % geringen Restwahrscheinlichkeit. Zur Analyse der *si*-Domäne von *KCNQ3* wurden wiederum Proteine aus Einschlusskörpern verwendet.

3.6.2 Identitätsnachweis der verschiedenen *Q3pET30*-Konstrukte

Die Identität der aufgereinigten Proteine konnte mittels Massenspektrometrie bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die dafür verwendeten Proben stammen aus Dialysen, welche auf einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden (Abb. 3.19). Diese zeigten neben der Monomer-Bande stets eine schwache Dimer-Bande.

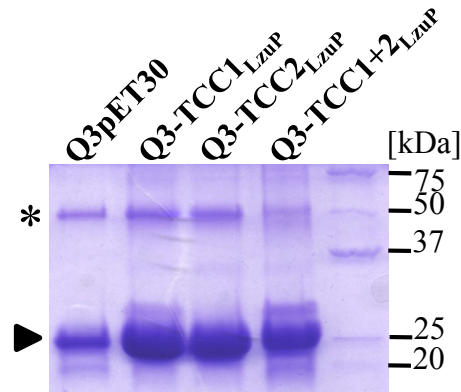


Abb. 3.19: Nachweis verschiedener *Q3pET30*-Konstrukte
Die Proteine der Dialysen in 50 mM CAPS pH 11 wurden auf einer 15 % SDS-PAGE aufgetrennt. Der Pfeil kennzeichnet die Monomere, der Stern die Dimer-Banden.

3.6.3 Löslichkeit und Renaturierung

Analog zur Wildtyp *si*-Domäne von *KCNQ2* (Kap. 3.3.1) wurde auch der entsprechende Bereich von *KCNQ3* mittels Dialyse und schnellem Verdünnen untersucht. Die salzabhängige Verringerung der Löslichkeit von *Q3pET30* war bei pH 5 deutlich weniger stark ausgeprägt als bei *Q2pET30* (Abb. 3.20 A). Bei der direkten Dialyse der *Q3pET30* Proteine gegen 50 mM Na_2HPO_4 pH 7,3 war dieses im Gegensatz zu *Q2pET30* nicht löslich (Abb. 3.20 B).

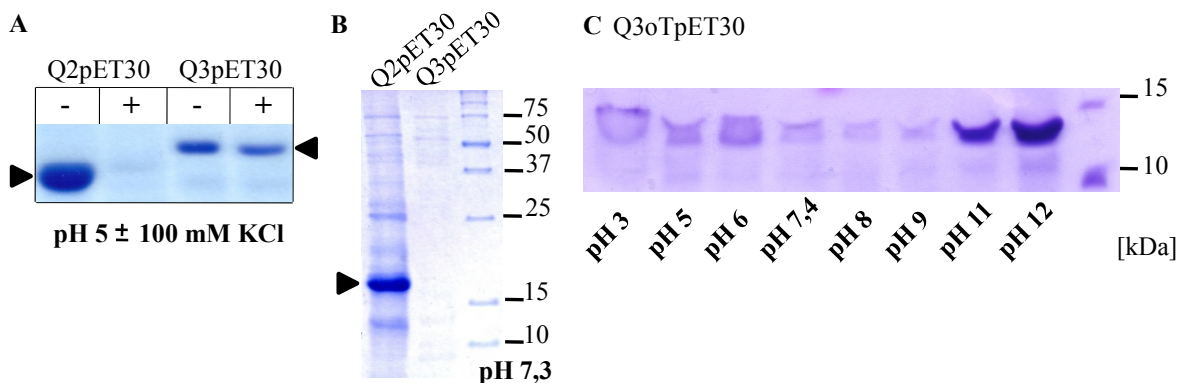


Abb. 3.20: Salz- und pH-abhängige Löslichkeit der Wildtyp *si*-Domänen von *KCNQ3*

(A) Dialyse der His₆-markierten *Q2pET30* und *Q3pET30* aus Einschlusskörpern ohne Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose gegen 50 mM Natriumacetat pH 5 ohne und mit 100 mM KCl. Die Monomerbanden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Das berechnete Molekulargewicht von *Q3pET30* beträgt 17,3 kDa. (B) Dialyse von *Q2pET30* und *Q3pET30* aus Einschlusskörpern gegen 50 mM Na_2HPO_4 pH 7,3. Die Monomerbande von *Q2pET30* ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. (C) Unmarkiertes *Q3oTpET30* aus Einschlusskörpern nach schnellem Verdünnen in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten. Als Puffer dienen 50 mM Natriumcitrat pH 3, 50 mM Natriumacetat pH 5, 50 mM Natriumphosphat pH 6, PBS pH 7,4, 50 mM Tris pH 8 und 9 sowie 50 mM CAPS pH 11 und 12. Das berechnete Molekulargewicht beträgt 12,6 kDa für *Q3oTpET30*. Alle Proben wurden auf einer 15 % SDS-PAGE aufgetrennt.

Grund dafür ist wahrscheinlich, dass die pH-abhängige Löslichkeit der *KCNQ3 si*-Domäne, gezeigt für *Q3oTpET30* (Abb. 3.20 C), deutlicher ausgeprägt ist als bei *Q2oTpET30*. Erst bei stark basischen pH-Werten von pH 11 und stärker noch bei pH 12 ergaben sich beim schnellen Verdünnen klare Proteinbanden in der SDS-PAGE. Bei sauren pH-Werten ist die Bande schwach und unscharf, aber etwas stärker als bei pH 7,4, pH 8 bzw. pH 9. Eine Renaturierung bei pH 11 und eine anschließende Dialyse gegen einen Puffer mit neutralem pH-Wert führte ebenfalls zur Präzipitation von *Q3pET30* (nicht gezeigt).

Die Wildtyp *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* unterscheiden sich also in ihrer pH- und Salzempfindlichkeit. Diejenige von *KCNQ3* erscheint dabei weniger empfindlich gegenüber Salz, ist allerdings nur bei stark basischen pH-Werten löslich.

3.7 Analyse der *si*-Domäne von *KCNQ3*

3.7.1 SEC der Wildtyp *si*-Domäne von *KCNQ3* bei pH 11

Zunächst wurden die beiden Wildtyp-Konstrukte *Q3oTpET30* und *Q3pET30* wie die *si*-Domäne von *KCNQ2* (Kap. 3.3.3) mittels SEC in 50 mM CAPS pH 11 untersucht. Bei der Auftrennung der Proteine der *Q3oTpET30* Dialyse auf einer Superdex 75-Säule befand sich das Protein nahezu vollständig im Ausschlussvolumen (Abb. 3.21 A). Dessen *Peak* wies allerdings eine leichte „Schulter“ auf. Diese konnte beim Wiederauftrag des aufkonzentrierten Ausschlussvolumens (Abb. 3.21 B) auf einer Superdex 200-Säule besser getrennt werden und zeigte sich als breites Signal nach dem Ausschlussvolumen bis etwa 78,7 ml. In diesem könnten sich verschiedene Spezies befinden, rechnerisch endet der *Peak* bei einem 2,57mer.

Im Gegensatz dazu sind in der *Q3pET30* Dialyse (Abb. 3.21 C) neben dem Protein im Ausschlussvolumen auch Dimere und ganz schwach Tetramere enthalten. Die Auftrennung von *Q3pET30* wurde mehrfach wiederholt. Dabei schwankte der Anteil der jeweiligen Oligomere deutlich (nicht gezeigt).

Die Rechromatographie der aufkonzentrierten *Q3pET30* Dimere (Abb. 3.21 D) ergab wiederum Dimere und Protein im Ausschlussvolumen. Insgesamt wies *Q3oTpET30* eine geringere Tendenz zur Ausbildung von spezifischen Oligomeren auf als das N-terminal markierte *Q3pET30*. Es ist nicht auszuschließen, dass die etwa 4,80 kDa große, ungeordnete Markierung die Löslichkeit der *si*-Domäne von *KCNQ3* verändert und damit die Oligomerisierung von *Q3pET30* erleichtert.

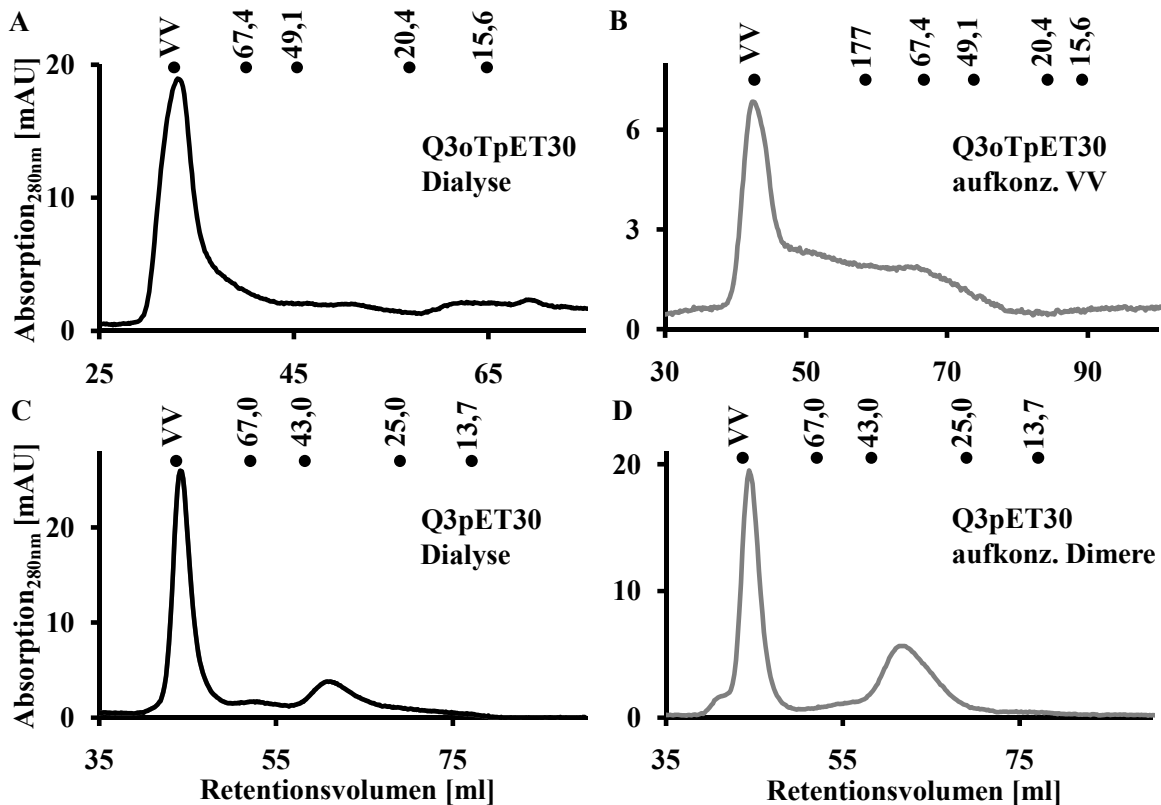


Abb. 3.21: Analyse von *Q3oTpET30* und *Q3pET30* in der SEC bei pH 11

(A) *Q3oTpET30* Dialyse auf einer Superdex 75-Säule (B) Rechromatographie des aufkonzentrierten Ausschlussvolumens von *Q3oTpET30* auf einer Superdex 200-Säule. (C) *Q3pET30* Dialyse auf einer Superdex 75-Säule (60,6 ml RV; 2,24mer bzw. 52,4 ml RV; 3,75mer) (D) Rechromatographie der aufkonzentrierten *Q3pET30* Dimere (61,8 ml RV; 2,11mer) auf der gleichen Säule wie in (C). Die Molekulargewichte betragen 12,6 kDa (*Q3oTpET30*) und 17,3 kDa (*Q3pET30*). Bei (A) und (B) sind die tatsächlichen, bei (C) und (D) die scheinbaren Größen (vgl. Tab. 3.3) der verwendeten Standardproteine beim ihrem jeweiligen Retentionsvolumen angegeben. Das Ausschlussvolumen ist mit VV gekennzeichnet.

3.7.2 SEC mutierter *si*-Domänen von *KCNQ3* bei pH 11

Die Einführung von Leucin/Prolin-Mutationen sollte das Verständnis der Oligomerisierung der *si*-Domäne von *KCNQ3* vertiefen. Die Auftrennungen der Proteine aus den Dialysen der Einzel- und Doppelmutanten zeigten zunächst ein übersichtliches Ergebnis (Abb. 3.22, Tab. 3.6): Neben dem Ausschlussvolumen bilden alle drei Proteine deutlich sichtbare Dimere aus. *Q3-TCC1_{LzuP}* weist darüber hinaus noch einen deutlichen Tetramer-Peak auf, welcher bei beiden Mutanten mit veränderter TCC2-Domäne, *Q3-TCC2_{LzuP}* und *Q3-TCC1+2_{LzuP}*, nur sehr schwach ist.

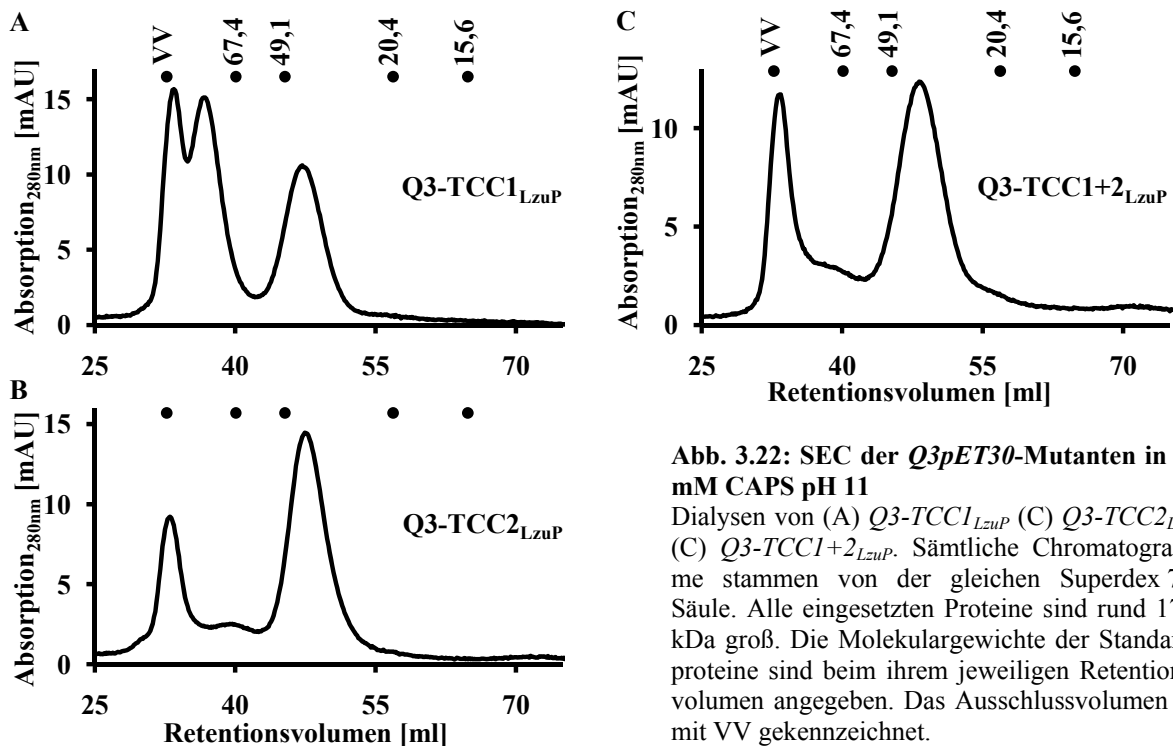


Abb. 3.22: SEC der Q3pET30-Mutanten in 50 mM CAPS pH 11
 Dialysen von (A) Q3-TCC1_{LzuP} (C) Q3-TCC2_{LzuP} (C) Q3-TCC1+2_{LzuP}. Sämtliche Chromatogramme stammen von der gleichen Superdex 75-Säule. Alle eingesetzten Proteine sind rund 17,3 kDa groß. Die Molekulargewichte der Standardproteine sind beim ihrem jeweiligen Retentionsvolumen angegeben. Das Ausschlussvolumen ist mit VV gekennzeichnet.

Die spezifischen Oligomere wurden aufkonzentriert und wieder auf einer Superdex 75-Säule aufgetrennt. Dabei erwiesen sie sich als nicht stabil, denn sämtliche Rechromatographien zeigten eine Vielzahl von *Peaks* (nicht gezeigt). Deren Intensität variierte außerdem bei Wiederholungen des Versuchs. Tab. 3.7 gibt stellvertretend, unabhängig von deren Stärke, die Signale einer Versuchsdurchführung wieder. Dabei zeigte sich insgesamt eine Tendenz zum Zerfall in kleinere Spezies, rechnerisch traten auch Monomere und noch kleinere Größen auf. Ob es sich dabei um Zerfallsprodukte oder um unterschiedlich gefaltete Monomere handelt, konnte nicht geklärt werden.

Protein	Retentionsvolumen [ml]	Oligomer (rechnerisch)
Q3-TCC1 _{LzuP}	33,4	VV
Q3-TCC1 _{LzuP}	36,6	4,81
Q3-TCC1 _{LzuP}	47,2	2,48
Q3-TCC2 _{LzuP}	33,0	VV
Q3-TCC2 _{LzuP}	39,4 (schwach)	4,03
Q3-TCC2 _{LzuP}	47,4	2,44
Q3-TCC1+2 _{LzuP}	33,4	VV
Q3-TCC1+2 _{LzuP}	39,0 (schwach)	4,14
Q3-TCC1+2 _{LzuP}	48,2	2,32

Tab. 3.6: Oligomere Eigenschaften von Q3-TCC1_{LzuP}, Q3-TCC2_{LzuP} und Q3-TCC1+2_{LzuP} bei pH 11
 Die Retentionsvolumina und die Anzahl der Untereinheiten den Oligomeren beziehen sich auf die Dialysen (Abb. 3.22). Das Ausschlussvolumen ist mit VV gekennzeichnet.

Q3-TCC1 _{LzuP} Tetramere		Q3-TCC1 _{LzuP} Dimere		Q3-TCC2 _{LzuP} Dimere		Q3-TCC1+2 _{LzuP} Dimere	
RV [ml]	Oligomer	RV [ml]	Oligomer	RV [ml]	Oligomer	RV [ml]	Oligomer
33,6	VV	32,8	VV	32,5	VV	32,9	VV
37,4	4,57	65,4	0,79	47,2	2,48	48,8	2,25
47,3	2,46	70,9	0,56	58,1	1,25	58,8	1,20
58,5	1,22	78,9	0,34	63,0	0,92	64,2	0,85
64,1	0,86	-	-	79,4	0,33	79,4	0,33

Tab. 3.7: Oligomere Eigenschaften der Rechromatographien der *Q3pET30*-Mutanten bei pH 11

Die Retentionsvolumina und die Anzahl der Untereinheiten den Oligomeren beziehen sich auf die Rechromatographien (nicht gezeigt) und sind unabhängig von der Stärke der *Peaks* aufgelistet. Das Ausschlussvolumen ist mit VV gekennzeichnet.

Die Oligomerisierung der *si*-Domäne von *KCNQ3* verläuft offensichtlich komplexer als die von *KCNQ2*. *Q3pET30* kann Dimere und Tetramere ausbilden, genau wie *Q3-TCC1_{LzuP}*. Letztendlich führt auch die Verringerung der *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit der TCC2-Domäne nicht zum vollständigen Verlust der Oligomerisierungseigenschaften. *Q3-TCC2_{LzuP}* und *Q3-TCC1+2_{LzuP}* bilden Dimere aus und unterscheiden sich erst bei ihrer Rechromatographie unwesentlich. Insgesamt erwiesen sich die verschiedenen *Q3pET30*-Konstrukte als weniger stabil als die entsprechenden *Q2pET30*-Konstrukte. Alle aufgefundenen Oligomere waren in der Rechromatographie instabil. Hierbei könnten Verdünnungs-, Konzentrierungs- oder Lagerungseffekte eine Rolle spielen, wobei eine deutliche Tendenz zur Ausbildung kleinerer Spezies festzustellen war.

3.7.3 Eigenschaften der Wildtyp *si*-Domäne von *KCNQ3* bei pH 12

Das schnelle Verdünnen von *Q3oTpET30* mit Puffern unterschiedlicher pH-Werte (Kap. 3.6.3) deutet darauf hin, dass dieses Protein in 50 mM CAPS pH 12 eine höhere Löslichkeit als in pH 11 aufweisen könnte. Deswegen wurden die Untersuchungen bei diesem pH-Wert wiederholt. Zusätzlich wurden die markierten Konstrukte auf einer Superdex 200-Säule aufgetrennt, um die gegenüber der *si*-Domäne von *KCNQ2* erhöhten Molekulargewichte besser auftrennen zu können.

Bei der Auftrennung der Proteine der *Q3oTpET30* Dialyse (Abb. 3.23 A) sind neben dem Ausschlussvolumen Dimere und ein schwaches Monomer-Signal zu erkennen. Der Wiederauftrag aufkonzentrierter Dimere (Abb. 3.23 B) ergab neben dem Ausschlussvolumen ein Signal bei 80,7 ml, welches einem Monomer (1,47mer) entspricht. Dieser *Peak* wies noch eine Schulter bei 89,5 ml auf (0,72mer). Ob es sich bei diesen Spezies um *Q3oTpET30*-Abbruchprodukte oder monomeres Protein handelt, ist unklar.

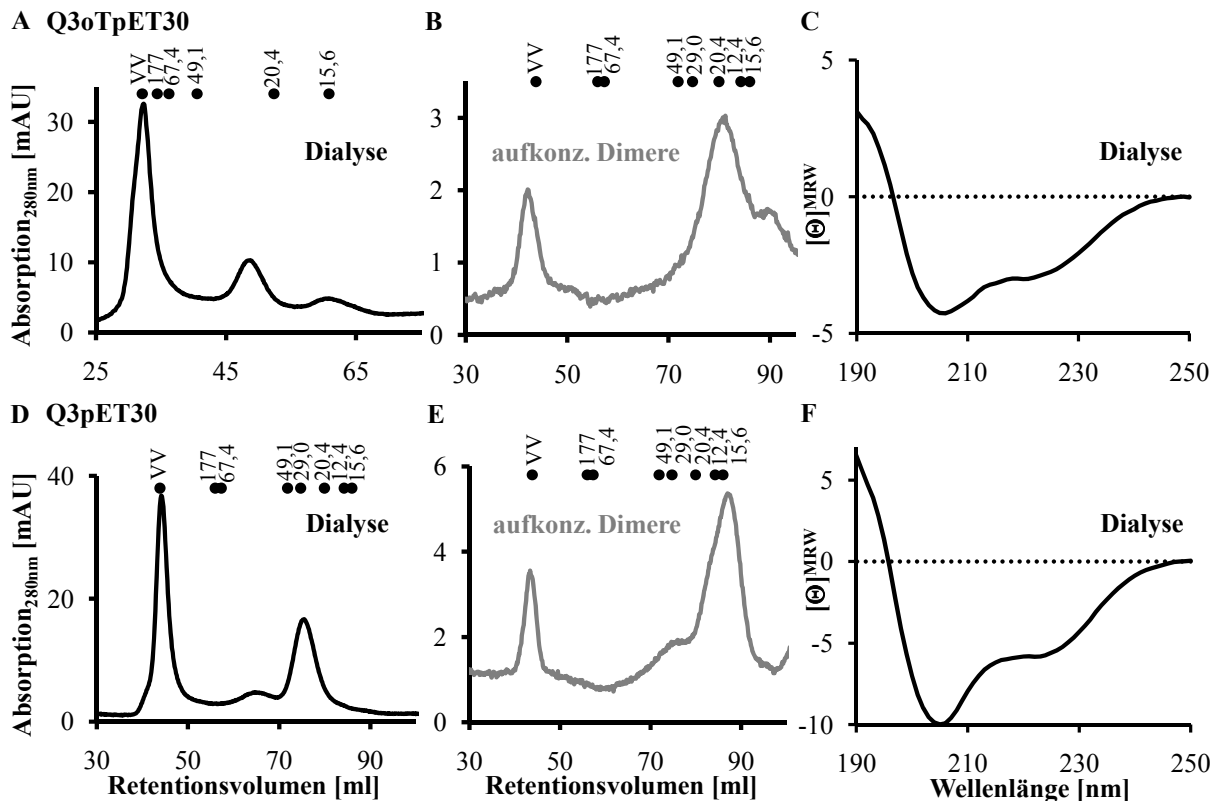


Abb. 3.23: Eigenschaften von *Q3oTpET30* und *Q3pET30* bei pH 12

(A) SEC der *Q3oTpET30* Dialyse auf einer Superdex 75-Säule (48,7 ml RV; 2,32mer bzw. 60,2 ml RV; 1,19mer) und (B) Rechromatographie der *Q3oTpET30* Dimere auf einer Superdex 200-Säule. Das Molekulargewicht beträgt etwa 12,6 kDa. Die Molekulargewichte der verwendeten Standardproteine sind bei ihrem jeweiligen Retentionsvolumen angegeben. Die beiden kleinsten Eichproteine der Superdex 200-Säule laufen in einer anderen Reihenfolge als nach ihrem Molekulargewicht zu erwarten wäre (vgl. Erläuterungen im Text). Das Ausschlussvolumen ist mit VV gekennzeichnet. (C) CD-Spektrum der *Q3oTpET30* Dialyse. (D) SEC der *Q3pET30* Dialyse auf einer Superdex 200-Säule und (E) Rechromatographie der *Q3pET30* Dimere auf derselben Säule wie in (D), (87,0 ml RV; 0,65mer). Das Molekulargewicht beträgt etwa 17,3 kDa. (F) CD-Spektrum der *Q3pET30* Dialyse. Die beiden CD-Spektren (C) und (F) weisen eine unterschiedliche Skalierung auf. Die molare Elliptizität $[\Theta]^{MRW}$ ist gegeben in $[\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dM}^{-1}] \cdot 10^{-3}$.

Die Auftrennung der Proteine der *Q3pET30* Dialyse (Abb. 3.23 D) ergab ebenfalls einen deutlichen Dimer-Peak. Darüber hinaus war noch ein schwaches Tetramer-Signal zu erkennen (Tab. 3.8). Die Rechromatographie der aufkonzentrierten *Q3pET30* Dimere (Abb. 3.23 E) führte wie bei *Q3oTpET30* zur Ausbildung kleinerer Spezies.

Für die Auftrennung der Dialysen der Wildtyp *si*-Domänen erwies sich 50 mM CAPS pH 12 als besser geeignet als pH 11. Die nachgewiesenen Dimere waren aber instabil. Auch bei diesem pH-Wert könnten Verdünnungs-, Konzentrierungs- oder Lagerungseffekte aufgetreten sein. Festzuhalten ist aber, dass sich die isolierte *si*-Domäne von *KCNQ3* bei pH 12 selbstständig falten und Dimere als kleinstes spezifisches Oligomer ausbilden kann.

Die CD-Spektren von *Q3oTpET30* und *Q3pET30* unterscheiden sich sowohl in ihrer Kurvenform als auch Amplitude (Abb. 3.23 C bzw. F). Im Gegensatz zu den entsprechenden

KCNQ2-Konstrukten (Kap. 3.3.4) ist die Amplitude des unmarkierten Konstrukts bei der *si*-Domäne von *KCNQ3* deutlich geringer. Der α -helikale Anteil beträgt 13,8 %, anhand der Sequenzvorhersage wären 33,0 % zu erwarten gewesen. Bei der *Q3pET30* beträgt dieser Anteil 18,7 %, was mit der Vorhersage von 23,7 % deutlich besser übereinstimmt. Der Unterschied in der Vorhersage beruht dabei auf der Anwesenheit der Markierung. Die bessere Übereinstimmung bei *Q3pET30* zeigt, dass der verwendete Puffer für die Analyse der markierten Form besser geeignet ist. Die N-terminale Markierung hat also in diesem Falle einen stabilisierenden Einfluss auf die in der CD-Spektroskopie sichtbare Faltung.

3.7.4 SEC mutierter *si*-Domänen von *KCNQ3* bei pH 12

Bei der Analyse der Wildtyp *si*-Domäne von *KCNQ3* traten in der Rechromatographie instabile Dimere auf. Auch in den Dialysen der mutierten *si*-Domänen von *Q3-TCC1_{LzuP}*, *Q3-TCC2_{LzuP}* und *Q3-TCC1+2_{LzuP}* bei pH 12 waren in allen Fällen Dimere enthalten (Abb. 3.24). Alle drei Mutanten wiesen außerdem ein äußerst breites Signal vom Ausschlussvolumen bis zum Dimer-*Peak* auf. Dieses ist so unscharf, dass darin neben Tetrameren auch eine Vielzahl anderer Spezies mit unterschiedlichen Konformationen enthalten sein könnte. Tab. 3.8 gibt eine Übersicht über die eindeutig bestimmten Oligomere der markierten Konstrukte.

Protein	Retentionsvolumen [ml]	Oligomer (rechnerisch)	Zuordnung
<i>Q3pET30</i>	64,2	4,12	Tetramere
<i>Q3pET30</i>	75,5	1,65	Dimere
<i>Q3-TCC1_{LzuP}</i>	75,6	1,63	Dimere
<i>Q3-TCC2_{LzuP}</i>	75,5	1,65	Dimere
<i>Q3-TCC1+2_{LzuP}</i>	76,1	1,58	Dimere

Tab. 3.8: Oligomere Eigenschaften verschiedener *Q3pET30*-Konstrukte

Die Retentionsvolumina und die Anzahl der Untereinheiten in den Oligomeren beziehen sich auf die Dialysen.

Die Rechromatographie von *Q3-TCC1_{LzuP}* *Dimeren* (Abb. 3.24 B) zeigt neben den prominenten *Dimeren* (74,5 ml RV; 1,79mer) deutlich *Tetramere* (60,8 ml RV; 5,45mer), welche aufgrund der Auflösung der Sekundärstruktur der TCC1-Domäne vergrößert gegenüber den *Q3pET30 Tetrameren* erscheinen. Der *Tetramer-Peak* aus der Rechromatographie korrespondiert mit dem Maximum des langgestreckten Signals der Dialyse, welches also offenbar auch *Tetramere* beinhaltet.

Beim Wiederauftrag der aufkonzentrierten *Q3-TCC2_{LzuP}* *Dimere* (Abb. 3.24 C) und *Q3-TCC1+2_{LzuP}* *Dimere* (Abb. 3.24 D) findet sich nur ein geringer Proteinanteil im Ausschlussvolumen wieder. Die *Dimere* sind überwiegend stabil, bilden aber wie bei *Q3oTpET30* (Abb. 3.23 B) eine „Schulter“ aus. In dieser könnten rechnerisch *Monomere* und

kleinere Spezies enthalten sein. Auch bei der Rechromatographie von *Q3-TCC1_{LzuP}* Dimeren tritt eine solche „Schulter“, allerdings sehr schwach, auf.

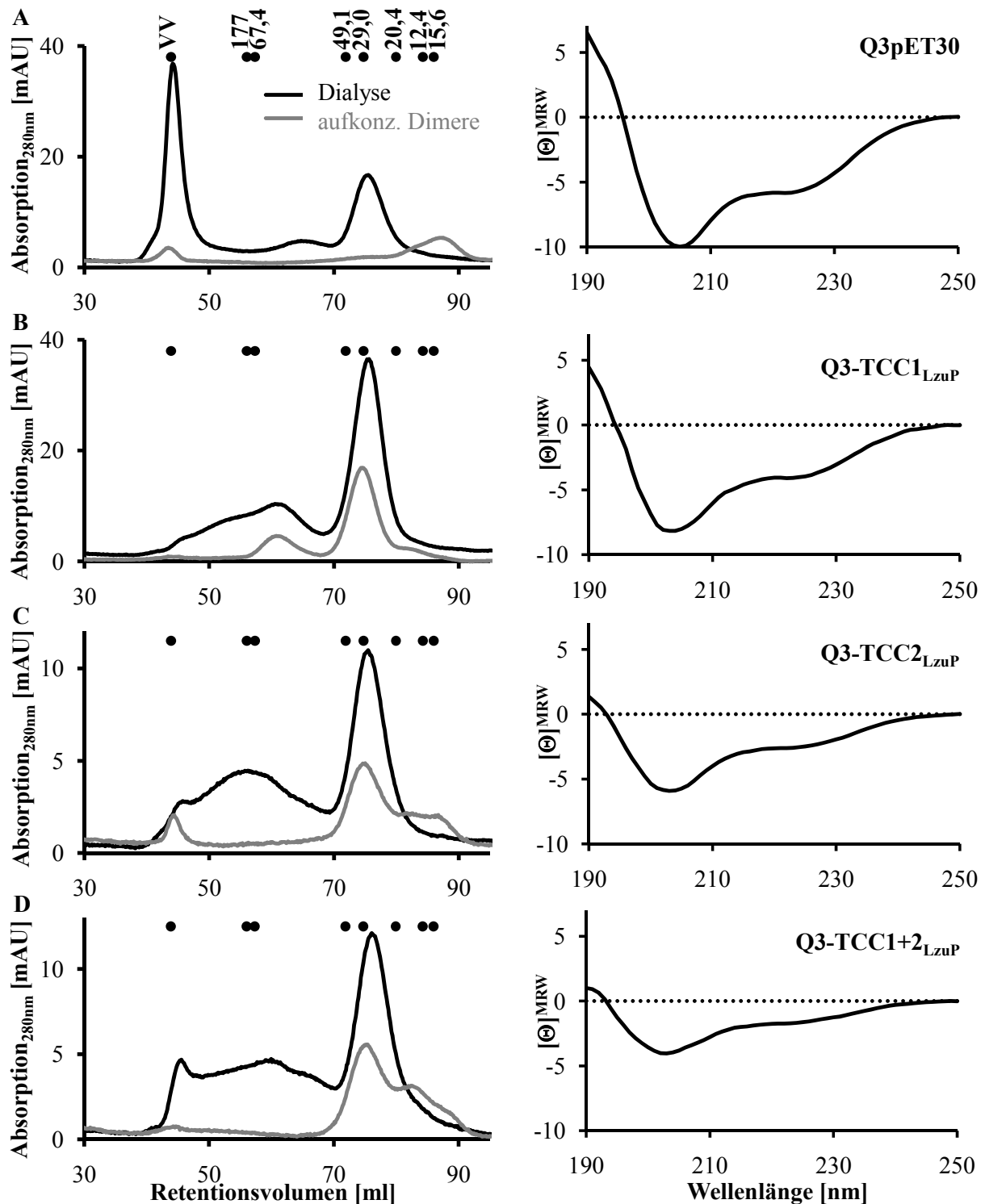


Abb. 3.24: Eigenschaften der *Q3pET30*-Konstrukte in der SEC und CD-Spektroskopie bei pH 12
 (A) *Q3pET30*, (B) *Q3-TCC1_{LzuP}*, (C) *Q3-TCC2_{LzuP}* und (D) *Q3-TCC1+2_{LzuP}*. Links: SEC auf einer Superdex 200-Säule bei pH 12. Die schwarzen Kurven zeigen die Chromatogramme der Dialysen, die grauen die der aufkonzentrierten Dimeren. Das Ausschlussvolumen ist mit VV gekennzeichnet. Die Molekulargewichte betragen alle etwa 17,3 kDa. Die theoretischen Größen der verwendeten Standardproteine sind bei ihrem jeweiligen Retentionsvolumen angegeben. Die dabei verwendete Eichgerade wurde bereits in Kap. 3.7.3 erläutert. Rechts: CD-Spektren der Dialysen. Die molare Elliptizität [Θ]^{MRW} ist gegeben in [deg·cm²·dM⁻¹]·10⁻³.

Alle Mutanten bilden also in der Dialyse Dimere aus, wobei es Hinweise auf die Anwesenheit größerer Oligomere, insbesondere Tetramere bei *Q3-TCC1_{LzuP}* wie auch bei *Q3pET30*, gibt. Insgesamt sind die bei pH 12 gewonnenen Dimere deutlich stabiler als jene bei pH 11, wobei eine Tendenz zum Zerfall in kleinere Spezies bestehen bleibt. Darüber hinaus weist der Wildtyp immer noch eine geringe Stabilität der wiederaufgetragenen Dimere auf.

3.7.5 CD-Spektroskopie markierter *si*-Domänen von *KCNQ3* bei pH 12

Die SEC der mutierten *si*-Domänen von *KCNQ3* hat keine wesentlichen Unterschiede in deren Oligomerisierung ergeben. Im Gegensatz dazu spiegeln die aus den CD-Spektren der markierten Konstrukte berechneten α -Helikalitäten, wie bei den entsprechenden Spektren von *Q2pET30* und dessen Mutanten (Kap. 3.4.2), die schrittweise Auflösung der Sekundärstruktur wieder (Abb. 3.24, Tab. 3.9). Dabei verringert sich die Amplitude mit sinkendem α -helikalem Anteil und die Spektren verschieben sich gegenüber dem des Wildtyps deutlich zu ungeordneteren Strukturen.

Protein	1. Minimum	2. Minimum / Wendepunkt	Schnittpunkt mit Nulllinie	α -Helikalität
Q3oTpET30	206	220	196-197	13,8 %
Q3pET30	205	222	195-196	18,7 %
Q3-TCC1 _{LzuP}	203	222	194-195	15,2 %
Q3-TCC2 _{LzuP}	203	221-222	192-193	12,1 %
Q3-TCC1+2 _{LzuP}	203	221-222	193-194	11,0 %

Tab. 3.9: Charakteristika der CD-Spektren der unterschiedlichen *Q3pET30*-Konstrukte bei pH 12

Der Leucin/Prolin-Austausch in der TCC2-Domäne von *Q3-TCC2_{LzuP}* führt, wie bei den *Q2pET30*-Mutanten, zu einer stärkeren Verringerung der α -Helikalität gegenüber dem Wildtyp *Q3pET30*, als die Störung des TCC1-Bereichs in *Q3-TCC1_{LzuP}* (Tab. 3.11). Das bedeutet, dass auch hier entweder die TCC2-Domäne stärker zum Anteil der α -Helices beiträgt als die TCC1-Domäne bzw. die Mutation die Sekundärstruktur der TCC2-Region nachhaltiger zerstört. Die Doppelmutante *Q3-TCC1+2_{LzuP}* weist mit 11,0 % nur noch eine geringe α -Helikalität auf.

3.8 Analyse der TCC-Peptide von *KCNQ3*

3.8.1 Sequenzanalyse

Um die Oligomerisierung der *si*-Domäne von *KCNQ3*, insbesondere deren Abhängigkeit vom pH-Wert, besser zu verstehen, wurden synthetische Peptide der einzelnen TCC-Domänen untersucht. Diese waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden, ihre Sequenzen waren analog zu den Untersuchungen von Jenke *et al.* (2003) ausgewählt worden. Tab. 3.10 gibt deren Aminosäuresequenz und Sekundärstrukturvorhersagen wieder.

Peptid	Aminosäuresequenz (vom N- zum C-Terminus)
Q3-TCC1-Peptid	H-DV KDVIE QYSAGHLD MLSRIKYLQ TRIDMIF-OH
Q3-TCC2-Peptid	H-S MMGK FKV KVERQ VQDMG KKLDF LVD MHM QHMERLQ-OH

Tab. 3.10: Aminosäuresequenzen der TCC-Peptide von *KCNQ3*

Für die rot dargestellten Aminosäuren wird eine α -Helix, für die grün dargestellten eine Schleifenstruktur vorhergesagt. Die chemische Formel der endständigen Gruppen an den N- und C-Termini ist gekennzeichnet.

Die Sekundärstrukturvorhersagen für die isolierten Peptide unterscheiden sich dabei geringfügig von denen der gesamten *si*-Domäne (Kap. 3.1), da diese einen kürzeren Bereich und damit eine veränderte Umgebung einzelner Aminosäuren aufweisen. Potenzielle Schleifen befinden sich wie zu erwarten an den Termini. Das *Q3-TCC1-Peptid* weist wiederum zwei Bereiche mit α -helikaler Vorhersage auf, welche von sieben Aminosäuren unterbrochen werden.

Die charakteristischen Eigenschaften und eine Übersicht über die Vorhersagen sind in Tab. 3.11 zusammengefasst. Die genaue Position der Peptide ist außerdem in Anhang I eingezeichnet.

	Q3-TCC1-Peptid	Q3-TCC2-Peptid
Anzahl der Aminosäurereste	31	35
Größe in kDa	3,70	4,25
Wahrscheinlichkeit für α -Helix	64,5 %	57,1 %
Wahrscheinlichkeit für <i>coiled-coil</i>	0,024	0,592
Vorhersage des isoelektrischen Punktes	pH 5,47	pH 8,20
spezifischer Absorptionskoeffizient Q [$l \cdot g^{-1}$]	31,405	31,815

Tab. 3.11: Daten und Vorhersagen für die TCC-Peptide von *KCNQ3*

Das *Q3-TCC1-Peptid* ist, entsprechend des kleineren Umfangs der TCC1-Domäne, auch das kleinere der beiden Peptide. Dessen isoelektrischer Punkt liegt dabei im sauren Bereich. Während die Vorhersage der α -Helikalität für das *Q3-TCC1-Peptid* größer ist als die des *Q3-TCC2-Peptids*, verhält es sich bei der *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit genau umgekehrt. Diese ist für die TCC1-Domäne äußerst gering.

3.8.2 SEC der TCC-Peptide von *KCNQ3*

Die SEC ergab für das *Q3-TCC1-Peptid* bei pH 11 Dimere und Tetramere (Abb. 3.25 A). Diese Probe ist nach der CD-Messung über Nacht gelagert worden, bevor sie mittels SEC aufgetrennt wurde. Bei pH 12 waren hingegen nur *Q3-TCC1-Peptid Dimere* nachzuweisen (Abb. 3.25 B). Auch das *Q3-TCC2-Peptid* zeigte bei pH 11 Dimere, es trat nur eine geringe Menge an Tetrameren auf (Abb. 3.25 C). Bei keiner der durchgeführten Messungen befand sich dabei Peptid im Ausschlussvolumen. Die Oligomere des *Q3-TCC2-Peptides* bei pH 12 ließen sich aufgrund eines Defekts der Superdex Peptid-Säule nicht mittels SEC analysieren.

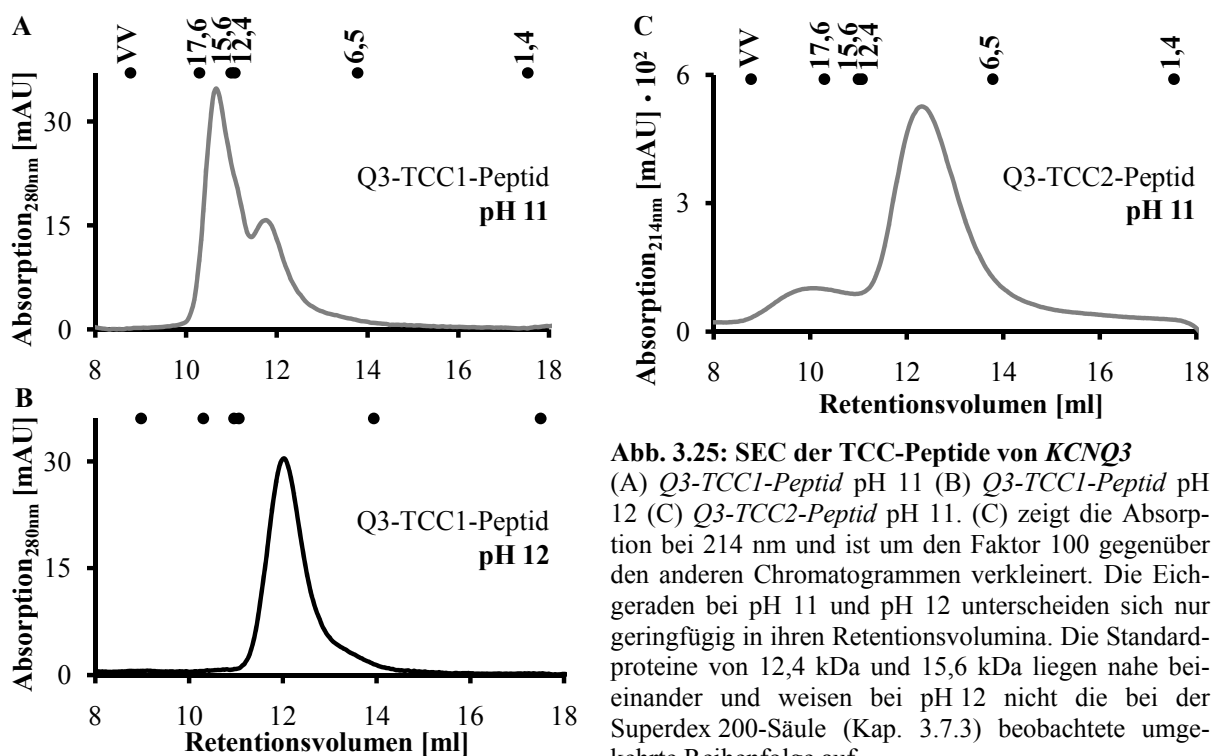


Abb. 3.25: SEC der TCC-Peptide von *KCNQ3*
 (A) *Q3-TCC1-Peptid* pH 11 (B) *Q3-TCC1-Peptid* pH 12 (C) *Q3-TCC2-Peptid* pH 11. (C) zeigt die Absorption bei 214 nm und ist um den Faktor 100 gegenüber den anderen Chromatogrammen verkleinert. Die Eichgeraden bei pH 11 und pH 12 unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Retentionsvolumina. Die Standardproteine von 12,4 kDa und 15,6 kDa liegen nahe beieinander und weisen bei pH 12 nicht die bei der Superdex 200-Säule (Kap. 3.7.3) beobachtete umgekehrte Reihenfolge auf.

Bei pH 11 weisen also beide Peptide Dimere und Tetramere auf, wobei letztere beim *Q3-TCC1-Peptid* deutlich stärker vertreten sind. Bei pH 12 zeigt das *Q3-TCC1-Peptid* nur noch Dimere. Tab. 3.12 fasst diese Ergebnisse nochmal zusammen.

Peptid	pH-Wert	Retentionsvolumen [ml]	Oligomer (rechnerisch)
Q3-TCC1-Peptid	pH 11	10,7	4,45
Q3-TCC1-Peptid	pH 11	11,8	2,99
Q3-TCC1-Peptid	pH 12	12,0	2,77
Q3-TCC2-Peptid	pH 11	10,0 (schwach)	4,80
Q3-TCC2-Peptid	pH 11	12,3	2,16

Tab. 3.12: Oligomere Eigenschaften der TCC-Peptide von *KCNQ3*

3.8.3 CD-Spektroskopie der TCC-Peptide von *KCNQ3*

Abb. 3.26 gibt die CD-Spektren der Peptide in 50 mM CAPS pH 11 bzw. pH 12 wieder. Deren Amplitude ist um den Faktor 10 größer als bei den CD-Spektren der gesamten *si*-Domäne. Tab. 3.13 gibt eine Übersicht über die Charakteristika der CD-Spektren. Da die hohen Amplituden der Messungen, welche für α -Helices typisch sind, zu einer zu hohen Wertung dieser Sekundärstruktur durch das verwendete Programm (Kap. 2.1.14) führten, wurde auf die Berechnung des genauen α -helikalen Anteils verzichtet.

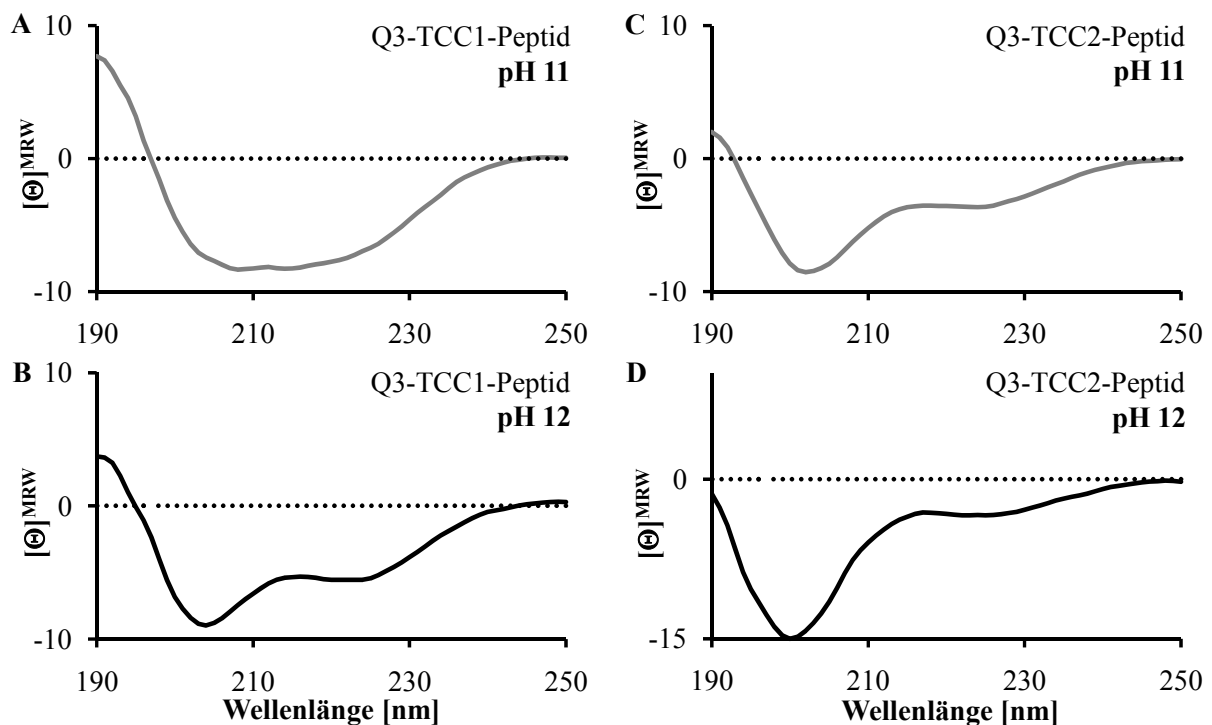


Abb. 3.26: CD-Spektren der TCC-Peptide von *KCNQ3*

(A) *Q3-TCC1-Peptid* pH 11 (B) *Q3-TCC1-Peptid* pH 12 (C) *Q3-TCC2-Peptid* pH 11 (D) *Q3-TCC2-Peptid* pH 12. Das CD-Spektrum von *Q3-TCC2-Peptid* bei pH 12 (D) weist eine andere Skalierung auf. Die molare Elliptizität $[\Theta]^{MRW}$ ist gegeben in $[\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dM}^{-1}] \cdot 10^{-4}$.

Auffällig ist zunächst die ungewöhnliche Form des Spektrums des *Q3-TCC1-Peptides* bei pH 11 (Abb. 3.26 A). Dieses wurde dreimal gemessen und wies auch bei unterschiedlichen Verdünnungen einen vergleichbaren Kurvenverlauf auf. Im Gegensatz zur Idealkurve eines α -helikalen Proteins (Abb. 3.8 A) weist es keine klar erkennbaren zwei Minima auf. Da die SEC die Anwesenheit von *Q3-TCC1-Peptid Dimeren* und *Tetrameren* zeigt, kann dieser Kurvenverlauf durch die Überlagerung der Spektren dieser beiden Spezies erklärt werden. Bei pH 12 hingegen liegen nur *Q3-TCC1-Peptid Dimere* vor und das CD-Spektrum ist weniger, aber dennoch deutlich α -helikal (Abb. 3.26 B).

Beide Spektren des *Q3-TCC2-Peptides* (Abb. 3.26 C und D) weisen weniger α -Helices auf als die Spektren des *Q3-TCC1-Peptides* bei gleichen pH-Werten. Außerdem ist die Abnahme der

α -Helikalität beim *Q3-TCC2-Peptid* von pH 11 auf pH 12 deutlich stärker als bei der TCC1-Domäne. Bei pH 12 weist dieses mit einem Minimum bei 200 nm und einem Schnittpunkt mit der Nulllinie bei einer Wellenlänge kleiner als 190 nm im Wesentlichen ungeordnete Charakteristika auf.

Die CD-Spektren des *Q3-TCC1-Peptids* spiegeln also die in der SEC gefundene Verschiebung von Tetrameren zu Dimeren wieder. Die Messung des *Q3-TCC2-Peptids* bei pH 12 weist auf eine eher ungeordnete Struktur hin, inwieweit dabei die bei pH 11 nachgewiesenen Dimere erhalten bleiben, lässt sich nicht sagen.

Peptid	pH	1. Minimum	2. Minimum / Wendepunkt	Schnittpunkt mit Nulllinie	α -Helikalität
Q3-TCC1-Peptid	11	208	214	196-197	96,3 %
Q3-TCC1-Peptid	12	204	~ 222	194-195	78,4 %
Q3-TCC2-Peptid	11	202	224	192-193	61,6 %
Q3-TCC2-Peptid	12	200	222	<190	34,1 %

Tab. 3.13: Charakteristika der CD-Spektren der TCC-Peptide von *KCNQ3*

3.9 Analyse der HA-markierten Wildtyp *si*-Domäne von *KCNQ3*

Um bei einer möglichen Interaktion der *si*-Domäne von *KCNQ3* mit der von *KCNQ2* die beiden Proteine besser unterscheiden zu können, wurde in *Q3pET30* die His₆-Markierung gegen ein HA-Epitop ausgetauscht. Der Aufbau des resultierenden Konstrukts *Q3pET30-HA* ist in Abb. 3.27 A wiedergegeben.

3.9.1 SEC von *Q3pET30-HA* Dimeren bei pH 11 und pH 12

Da für die Analyse von *Q3pET30* pH 12 geeigneter war als pH 11, wurden auch die Proteine der *Q3pET30-HA* Dialyse bei diesem pH-Wert aufgetrennt (Abb. 3.27 B). Dabei ergaben sich analog zum His₆-markierten *Q3pET30* (Kap. 3.7.3) zwei Signale: Ausschlussvolumen und Dimere. Letztere wurden konzentriert und erneut aufgetragen. Dabei erwiesen sie sich als stabil (Abb. 3.27 B). Die im Gegensatz zu den *Q3pET30* Dimeren vorhandene Stabilität der *Q3pET30-HA* Dimere kann im Prinzip nur auf die veränderte Markierung zurückzuführen sein.

Um die Interaktion von *Q3pET30-HA* mit *Q2pET30* auch bei pH 11 überprüfen zu können, wurde ein Teil der Dimere mittels Dialyse in pH 11 überführt. Im Vergleich zur direkten Dialyse von *Q3pET30* gegen diesen pH-Wert, in welchem im Verhältnis zum Ausschlussvolumen wenig Dimere nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.21 C), ergab sich bei der Umpufferung bereits isolierter *Q3pET30-HA* Dimere ein höherer Anteil an weiterhin

dimeren Spezies (Abb. 3.27 C, durchgängige Linie). Nur etwa ein Viertel des Proteins findet sich im Ausschlussvolumen wieder.

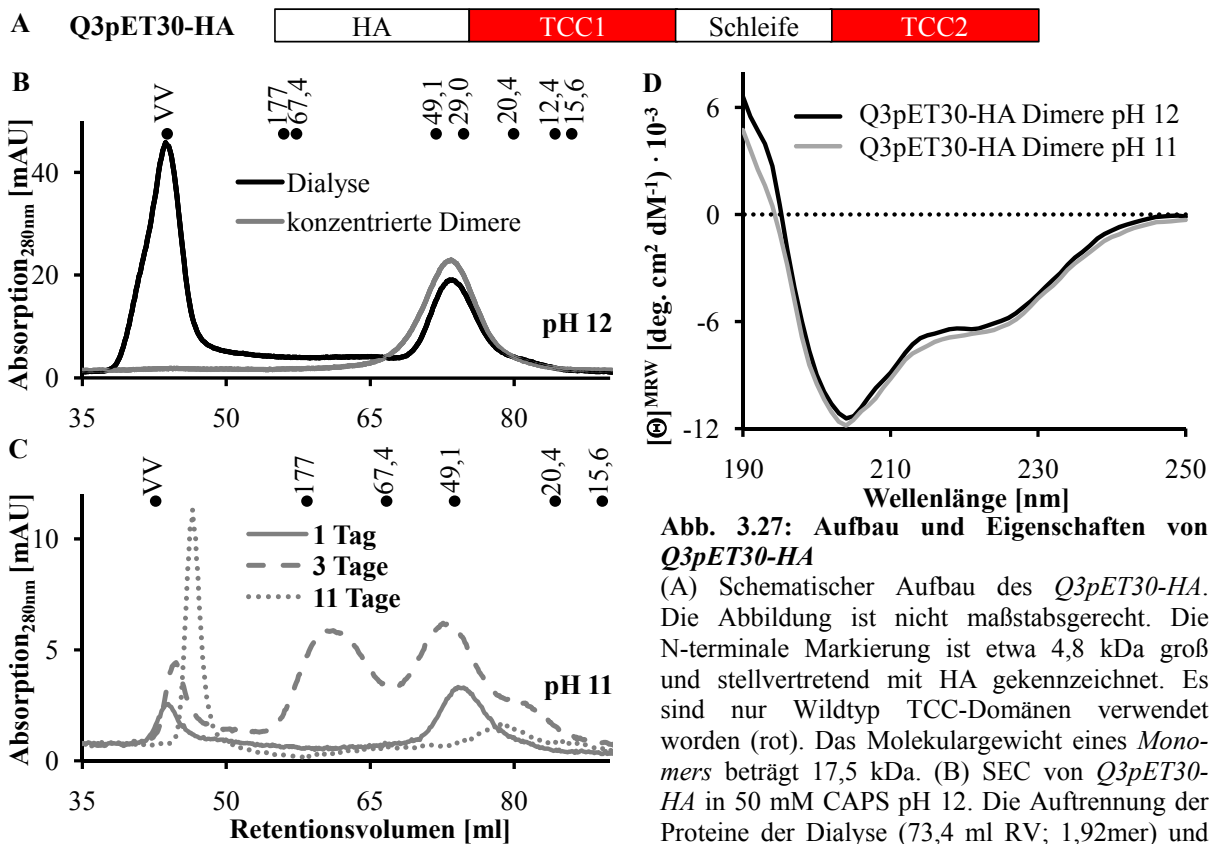


Abb. 3.27: Aufbau und Eigenschaften von Q3pET30-HA

(A) Schematischer Aufbau des Q3pET30-HA. Die Abbildung ist nicht maßstabsgerecht. Die N-terminale Markierung ist etwa 4,8 kDa groß und stellvertretend mit HA gekennzeichnet. Es sind nur Wildtyp TCC-Domänen verwendet worden (rot). Das Molekulargewicht eines Monomers beträgt 17,5 kDa. (B) SEC von Q3pET30-HA in 50 mM CAPS pH 12. Die Auftrennung der Proteine der Dialyse (73,4 ml RV; 1,92mer) und der aufkonzentrierten Dimere erfolgte auf einer Superdex 200-Säule bei pH 12. Die Reihenfolge der beiden kleinsten Standardproteine wurde bereits in Kap. 3.7.3 erläutert. Das Ausschlussvolumen ist mit VV gekennzeichnet. (C) SEC von Q3pET30-HA Dimeren in 50 mM CAPS pH 11 nach unterschiedlichen Lagerungszeiten. Die Auftrennung der umgepufferten Dimer-Lösungen erfolgte auf einer Superdex 200-Säule bei pH 11. Die Molekulargewichte der Standardproteine sind bei ihrem jeweiligen Retentionsvolumen angegeben. Ausgewählte Peaks: 1 Tag (74,4 ml RV; 2,58mer), 3 Tage (61,2 ml RV; 7,29mer bzw. 80,1 ml RV; 1,66mer), 11 Tage (74,8 ml RV; 2,52mer). (D) CD-Spektren konzentrierter Q3pET30-HA Dimere bei pH 11 und pH 12.

der aufkonzentrierten Dimere erfolgte auf einer Superdex 200-Säule bei pH 12. Die Reihenfolge der beiden kleinsten Standardproteine wurde bereits in Kap. 3.7.3 erläutert. Das Ausschlussvolumen ist mit VV gekennzeichnet. (C) SEC von Q3pET30-HA Dimeren in 50 mM CAPS pH 11 nach unterschiedlichen Lagerungszeiten. Die Auftrennung der umgepufferten Dimer-Lösungen erfolgte auf einer Superdex 200-Säule bei pH 11. Die Molekulargewichte der Standardproteine sind bei ihrem jeweiligen Retentionsvolumen angegeben. Ausgewählte Peaks: 1 Tag (74,4 ml RV; 2,58mer), 3 Tage (61,2 ml RV; 7,29mer bzw. 80,1 ml RV; 1,66mer), 11 Tage (74,8 ml RV; 2,52mer). (D) CD-Spektren konzentrierter Q3pET30-HA Dimere bei pH 11 und pH 12.

Die Überführung bereits isolierter Dimere mittels Dialyse in pH 11 hat gegenüber der direkten Dialyse den Vorteil, dass auch die jetzt im Ausschlussvolumen befindlichen Proteine prinzipiell in der Lage sind, Dimere auszubilden. Diese Aggregate werden also nicht von zum Teil defekten oder unspezifischen Proteinen gebildet.

3.9.2 Zeitabhängigkeit der Oligomerisierung

Bei der SEC von Q3pET30 (Abb. 3.21 C) und Q3-TCC1_{LzuP} (Abb. 3.22 A) bei pH 11 war eine gewisse Menge an Tetrameren beobachtet worden. Um zu überprüfen, inwieweit diese durch Konzentrations- oder Lagerungseffekte verursacht worden sind, wurde die Umpufferung wiederholt und die Dialyse nach 3 Tagen erneut mittels SEC analysiert (Abb. 3.27 C, gestrichelt). Dabei zeigte sich zusätzlich zu den Dimeren ein Tetramer-Peak sowie eine

schwache Monomer-, „Schulter“. Das Tetramer ist dabei als rechnerisches 7,29mer vergleichsweise groß, wobei dessen Größe wahrscheinlich aufgrund der eingesetzten Eichkurve überhöht erscheint.

Da die Lagerungszeit offenbar einen Einfluss auf die Oligomerität des *Q3pET30-HA* hat, wurden ungepufferte Dimere für 11 Tage bei 4°C gelagert. Das Chromatogramm dieser Lösung wies fast ausschließlich Protein im Ausschlussvolumen auf (Abb. 3.27 C, gepunktet). Nur noch ein schwacher Dimer-*Peak* (korrigiert um die technisch bedingte Rechtsverschiebung des Chromatogrammes) ist verblieben.

Drei Wochen alte *Q3pET30-HA Dimer* Lösung pH 11, welche für 10 Minuten bei 80°C erwärmt wurde, zeigte in der SEC nur Protein im Ausschlussvolumen (nicht gezeigt). Die Erwärmung führte also nicht zu Wiederausbildung kleinerer Oligomere.

Aufgrund der zeitabhängigen Veränderung der Oligomeren-Anteile wurde in allen Messungen der verschiedenen *KCNQ3*-Konstrukte bei pH 11 und pH 12 (Kap. 3.7.1 bis 3.7.4) diejenige Messung mit dem höchsten Dimer-Anteil dargestellt. Dies erfolgt in der Annahme, dass diese Chromatogramme den frühesten nachgewiesenen Zustand der Lösung widerspiegeln. Aufgrund der mehrstündigen Dauer der Dialysen, der CD-Messungen und der SEC ließ sich dabei eine gewisse, und vor allem unterschiedlich lange, Lagerungszeit bei 4°C nicht vermeiden. Die Umpufferung von *Q3pET30-HA Dimeren* aus pH 12 ermöglicht aber die Gewinnung von Wildtyp-Dimeren bei pH 11.

3.9.3 CD-Spektroskopie von *Q3pET30-HA Dimeren* bei pH 11 und 12

Um auszuschließen, dass sich die Faltung und damit die Sekundärstruktur von frischen *Q3pET30-HA Dimeren* bei pH 11 mit der bei pH 12 unterscheidet, wurde diese mittels CD-Spektrometrie überprüft (Abb. 3.27 D). Die Spektren bei beiden pH-Werten stimmen dabei sehr gut überein. Lediglich bei Wellenlängen kleiner als 195 nm gibt es Abweichungen, die durch die Absorption der Puffer-Substanz CAPS in diesem Bereich erklärt werden kann.

Die CD-Spektren der *Q3pET30-HA Dimere* unterscheiden sich also genau wie die der *Q2pET30 Tetramere* bei pH 11 und pH 12 (Abb. 3.13 B) nicht wesentlich. Die *Q3pET30-HA Dimere* konnten somit für Interaktionsversuche verwendet werden, sofern diese nicht länger gelagert wurden.

3.9.4 Temperaturverhalten der *Q3pET30-HA Dimeren* bei pH 12

Wie bereits bei den *Q2pET30 Tetrameren* (Kap. 3.5.5) beschrieben, ist das Temperaturverhalten von Oligomeren dazu geeignet, *coiled-coil* Strukturen nachzuweisen. Deswegen wurde die Thermostabilität der *Q3pET30-HA Dimere* analog zu den *Q2pET30 Tetrameren* analysiert, wobei die Versuche allerdings in 50 mM CAPS pH 12 durchgeführt wurden. Um die Vergleichbarkeit der Schmelzkurven zu gewährleisten, wurden ähnliche Konzentrationen verwendet.

Die Schmelzkurve der *Q3pET30-HA Dimere* zeigt eine langsame, stufenlose Denaturierung (Abb. 3.28 A). Diese beginnt wie bei den *Q2pET30 Tetrameren* vor der Raumtemperatur und ist im Gegensatz dazu bereits bei etwa 40°C abgeschlossen. Ihr Verlauf ist exponentiell, wobei die Denaturierung der *Q3pET30-HA Dimere* zu Beginn wesentlich schneller verläuft als bei den *Q2pET30 Tetrameren*.

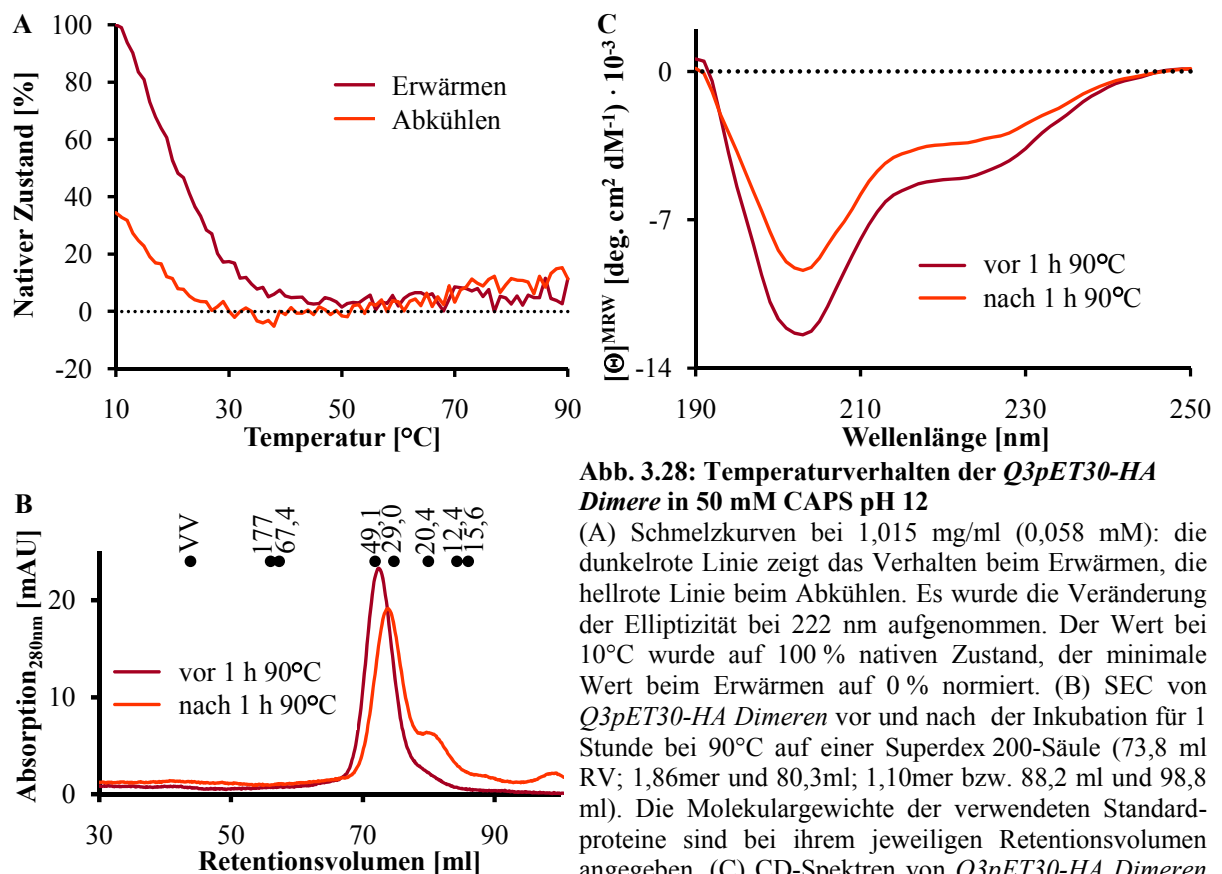


Abb. 3.28: Temperaturverhalten der *Q3pET30-HA Dimere* in 50 mM CAPS pH 12

(A) Schmelzkurven bei 1,015 mg/ml (0,058 mM): die dunkelrote Linie zeigt das Verhalten beim Erwärmen, die hellrote Linie beim Abkühlen. Es wurde die Veränderung der Elliptizität bei 222 nm aufgenommen. Der Wert bei 10°C wurde auf 100 % nativen Zustand, der minimale Wert beim Erwärmen auf 0 % normiert. (B) SEC von *Q3pET30-HA Dimeren* vor und nach der Inkubation für 1 Stunde bei 90°C auf einer Superdex 200-Säule (73,8 ml RV; 1,86mer und 80,3ml; 1,10mer bzw. 88,2 ml und 98,8 ml). Die Molekulargewichte der verwendeten Standardproteine sind bei ihrem jeweiligen Retentionsvolumen angegeben. (C) CD-Spektren von *Q3pET30-HA Dimeren* vor und nach 1 Stunde bei 90°C. Gemessen wurden die Proben aus (B).

Der unterschiedliche Kurvenverlauf von *Q3pET30-HA* lässt sich dadurch erklären, dass es sich bei der eingesetzten Spezies um Dimere handelte. In diesen steht eine Untereinheit nur in Kontakt mit einer weiteren α -Helix, während dies im *Q2pET30 Tetramer* drei sind. Allerdings könnte auch die Wechselwirkung in der *coiled-coil si*-Domäne von *KCNQ3* schwächer sein als in der von *KCNQ2*. Dafür spräche auch, dass die Denaturierung bereits bei einer relativ geringen Temperatur abgeschlossen ist und nur etwa ein Drittel der Proteine beim Abkühlen renaturiert wird.

In der SEC hingegen zeigten sich die 1 Stunde bei 90°C erwärmten *Q3pET30-HA Dimere* (etwa 1 mg/ml) als überwiegend reversibel denaturierbar und thermostabil (Abb. 3.28 B). Nach dem Abkühlen beinhaltete die Probe zwar überwiegend Dimere, allerdings auch eine deutlich erkennbare Menge an Monomeren und kleineren Spezies. Die durch das Erwärmen verursachte irreversible Denaturierung, welche in der SEC sichtbar wird, betrifft bei den *Q3pET30-HA Dimeren* einen größeren Anteil der eingesetzten Gesamtmenge als bei den *Q2pET30 Tetrameren*. Die Denaturierung führte aber ausschließlich zur Ausbildung kleinerer Spezies und keinesfalls zur Bildung von Tetrameren.

Die CD-Spektren der *Q3pET30-HA Dimere* vor und nach dem Erhitzen für 1 Stunde bei 90°C (Abb. 3.28 C) weisen wie die Spektren der *Q2pET30 Tetramere* (Abb. 3.15 C) einen ähnlichen Kurvenverlauf, aber eine unterschiedliche Amplitude auf. Der Faktor 1,32 führt das Spektrum nach dem Erhitzen bis auf geringe Abweichungen in das Spektrum davor über.

Die *Q3pET30 Dimere* bilden also eine *coiled-coil*-Struktur aus, dessen Faltung zum Teil reversibel ist. Der mittels Schmelzkurve gemessene Anteil an wiedergebildeten Dimeren ist dabei kleiner als der mittels SEC bestimmte.

3.10 Interaktion von *Q2pET30 Tetrameren* und *Q3pET30-HA Dimeren*

Um eine Interaktion der *si*-Domäne von *KCNQ2* mit der von *KCNQ3* zu untersuchen, wurden die isolierten *Q2pET30 Tetramere* und die *Q3pET30-HA Dimere* im äquimolaren Verhältnis miteinander gemischt und für 10 Minuten bei 80°C inkubiert. Die dafür nötigen Voraussetzungen waren, dass diese sowohl bei pH 11 als auch bei pH 12 stabil sind und dass die Proteine bei leichtem Erwärmen nicht vollständig und irreversibel denaturiert werden (Abb. 3.13 und 3.15 bzw. 3.27 und 3.28). Eine Erwärmung der Oligomere für 10 Minuten bei 80°C wurde durchgeführt, um insbesondere die *Q2pET30 Tetramere* aufzulösen und so die Bedingungen für eine mögliche Interaktion zu optimieren.

Die resultierende Proteinlösung war dabei stets klar. Dies bedeutet, dass sich weder vor, noch durch das Erwärmen ein unlöslicher Niederschlag aus beiden Proteinen gebildet hat.

3.10.1 Interaktion in 50 mM CAPS pH 12

Bei der Auftragung der Proteinmischung (Endkonzentration 1,42 mg/ml) bei pH 12 auf eine Superdex 75-Säule (Abb. 3.29 A) war die Trennung der Signale voneinander deutlich besser als auf einer Superdex 200-Säule (Abb. 3.29 B). Die beiden unterschiedlichen Proteinspezies wurden in äquimolaren Verhältnissen eingesetzt. Der deutlich sichtbare Unterschied in der Signalstärke ist der Tatsache geschuldet, dass *Q3pET30-HA* wegen seines höheren Anteils an aromatischen Aminosäuren dreimal stärker UV-Licht absorbiert (vgl. Anhang I).

Auf der Superdex 75-Säule ergaben sich zwei *Peaks*. Ersteres Signal könnte einem *Q2pET30 Tetramer* (3,78mer) oder einem etwas größeren *Q2pET30/Q3pET30-HA Tetramer* (3,43mer) im Verhältnis 2:2 entsprechen. Letzteres wäre durch das größere Molekulargewicht der *si*-Domäne von *KCNQ3* insgesamt schwerer als das reine *Q2pET30 Tetramer*. Die Unterscheidung zwischen diesen (58,5 kDa M_w) und *Q2pET30/Q3pET30-HA Tetrameren* (64,2 kDa M_w) ist aufgrund des geringen Unterschieds in der SEC aber nicht möglich. Zwar hätte ein 2:2 Heteromer ein um etwa 10 % größeres Molekulargewicht, dieses muss aber nicht zwingend zu einem veränderten hydrodynamischen Radius führen.

Eine stabiles Reaktionsprodukt, welches sich unter Umständen hinter dem *Peak* des *Q2pET30 Tetramers* versteckt, müsste allerdings die Absorption des *Q3pET30-HA Dimer* Signals erniedrigen und die des Tetramers erhöhen, so dass ein Angleichen der *Peaks* zu beobachten wäre. Dieses Verhalten kann bei pH 12 so nicht beobachtet werden.

Das zweite Signal im Chromatogramm könnte einem *Q3pET30-HA Dimer* zugeordnet werden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass sich in diesem durch das Erwärmen hervorgerufene *Q2pET30 Dimere* befinden (vgl. Abb. 3.15 B). Außerdem ist das Auftreten einer geringen Menge an Protein im Ausschlussvolumen und einer leichten „Schulter“ (ab 51 ml RV) zu bemerken, welche ebenfalls auf die Erwärmung der Probe zurückzuführen sein könnten. Insgesamt zeigte die Auftrennung des Proteingemischs mittels SEC keine eindeutige Bildung eines neuen Reaktionsprodukts.

Der Nachweis der Proteine in den einzelnen Fraktionen der SEC mittels SDS-PAGE (Abb. 3.29 C) legt nahe, dass es sich bei den Signalen um eine Überlagerung zweier Spezies, weniger um eine Interaktion handelt. Dabei ist in den Fraktionen 1 bis 4, mit dem Maximum in Fraktion 3, der Anteil an *Q2pET30* am größten. Dies spiegelt den dem Tetramer zugeordnetem *Peak* wieder. In Fraktion 3 ist das Verhältnis von *Q2pET30* zu *Q3pET30-HA* deutlich auf Seiten der *si*-Domäne von *KCNQ2*. Es kann somit kein reines 2:2 Heteromer vorliegen.

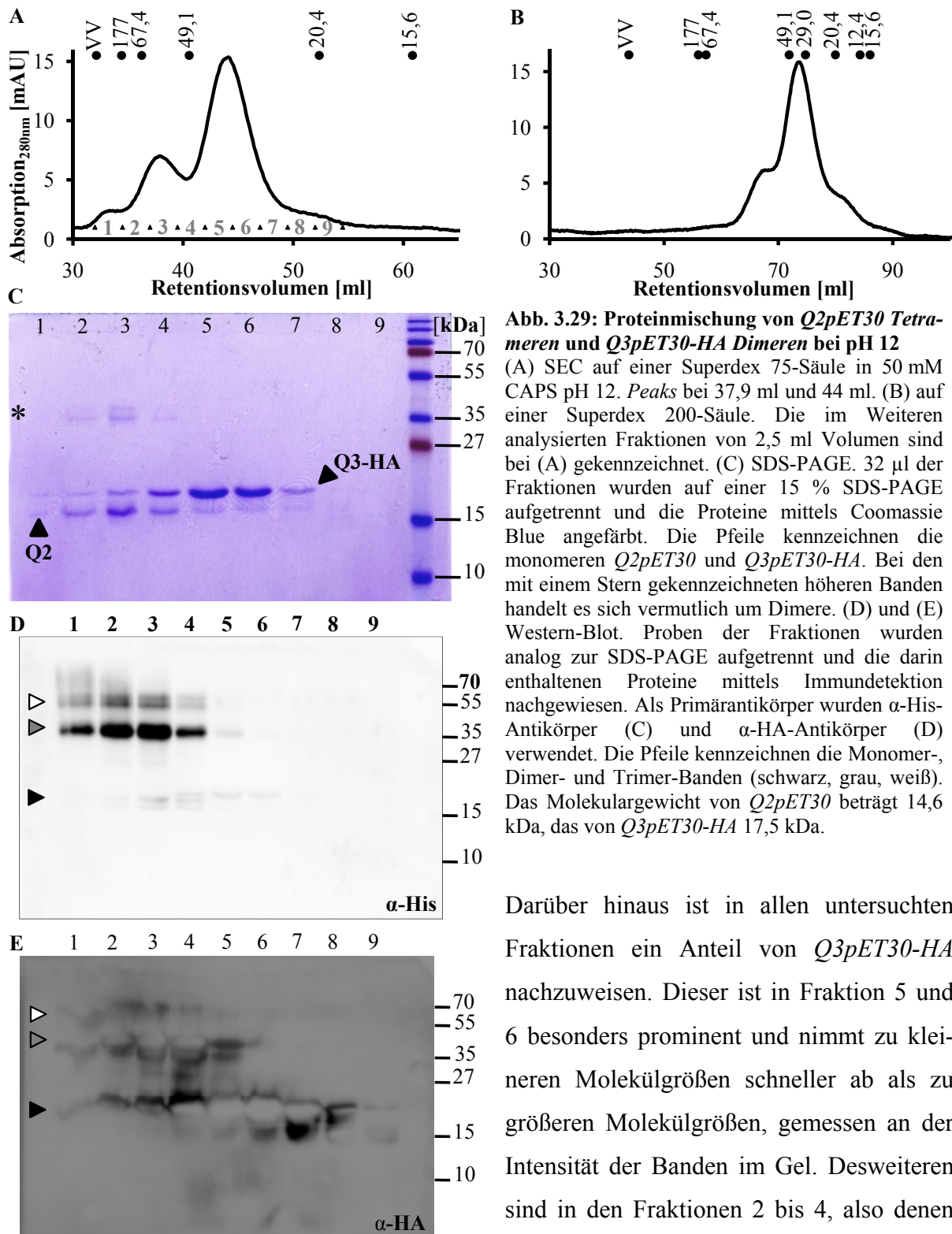


Abb. 3.29: Proteinmischung von *Q2pET30 Tetrameren* und *Q3pET30-HA Dimeren* bei pH 12
 (A) SEC auf einer Superdex 75-Säule in 50 mM CAPS pH 12. *Peaks* bei 37,9 ml und 44 ml. (B) auf einer Superdex 200-Säule. Die im Weiteren analysierten Fraktionen von 2,5 ml Volumen sind bei (A) gekennzeichnet. (C) SDS-PAGE. 32 µl der Fraktionen wurden auf einer 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Coomassie Blue angefärbt. Die Pfeile kennzeichnen die monomeren *Q2pET30* und *Q3pET30-HA*. Bei den mit einem Stern gekennzeichneten höheren Banden handelt es sich vermutlich um Dimere. (D) und (E) Western-Blot. Proben der Fraktionen wurden analog zur SDS-PAGE aufgetrennt und die darin enthaltenen Proteine mittels Immundetektion nachgewiesen. Als Primärantikörper wurden α -His-Antikörper (C) und α -HA-Antikörper (D) verwendet. Die Pfeile kennzeichnen die Monomer-, Dimer- und Trimer-Banden (schwarz, grau, weiß). Das Molekulargewicht von *Q2pET30* beträgt 14,6 kDa, das von *Q3pET30-HA* 17,5 kDa.

Darüber hinaus ist in allen untersuchten Fraktionen ein Anteil von *Q3pET30-HA* nachzuweisen. Dieser ist in Fraktion 5 und 6 besonders prominent und nimmt zu kleineren Molekülgrößen schneller ab als zu größeren Molekülgrößen, gemessen an der Intensität der Banden im Gel. Desweiteren sind in den Fraktionen 2 bis 4, also denen eines Tetramers in der SEC, noch *Q3pET30-HA Dimer*-Banden in der SDS-PAGE zu erkennen.

Um die Identität der Proteine zu bestätigen, wurden die Fraktionen der SEC unter gleichen Bedingungen auch im Western-Blot analysiert. Dabei erfolgte die Detektion von *Q2pET30*

über die His₆-Markierung und von *Q3pET30-HA* über das HA-Epitop. Das so erhaltene Bild stimmt auf den ersten Blick nicht mit dem Coomassie-Gel überein.

Zwar finden sich die Monomerbanden der SDS-PAGE in beiden Blots wieder, allerdings sind dort größere Banden deutlich stärker vertreten. Dies lässt sich nicht alleine mit einem „Durchblotten“ der kleineren Proteine durch die Membran erklären. Das könnte zwar erklären, warum die Monomer-Bande im Western-Blot schwächer als in der SDS-PAGE vertreten ist, erklärt aber nicht, warum die Banden größerer Spezies nur in den vorderen Fraktionen auftreten.

Beim α -His-Blot (Abb. 3.29 D) lassen sich diese als Dimere und Trimere beschreiben, im Ausschlussvolumen (Fraktion 1) sind darüber hinaus noch hochmolekulare, unscharfe Proteinsignale zu beobachten. Das Auftreten der Dimer- und Trimer-Banden ist auf die Fraktionen der Tetramere beschränkt und tritt, trotz der Anwesenheit von *Q2pET30* in den späteren Fraktionen, dort nicht auf. Dies könnte allerdings auch von der dort geringeren Konzentration abhängen.

Damit lässt sich jedoch nicht erklären, dass *Q3pET30-HA* ebenfalls in den tetrameren Fraktionen größere Banden zeigt (Abb. 3.29 E), da dieses Protein in den späteren Fraktionen am stärksten vertreten ist. Dort treten jedoch keine Dimer- oder Trimer-Banden auf. Dies lässt sich auch nicht durch das sehr starke Signal des α -HA-Antikörpers und die damit einhergehende Überbelichtung der Aufnahme erklären. Auffällig ist außerdem, dass das eingesetzte *Q3pET30-HA Dimer* auch noch größere als dimere Banden aufweist.

Dass die größeren Banden in beiden Blots auf gleicher Höhe auftreten, spricht dafür, dass es sich dabei um aus *Q2pET30* und *Q3pET30-HA* bestehende, gegenüber der Denaturierung mit SDS recht stabile, heteromere Spezies handelt. Diese könnten sich bei der SEC in dem *Peak* des *Q2pET30 Tetramers* verbergen.

Eine Aussage über die Stöchiometrie lässt sich dabei allerdings nicht machen. Nur bei einer annähernd hundertprozentigen 2:2 Interaktion der isolierten *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* würde der Dimer-*Peak* zugunsten des Tetramer-*Peaks* fortfallen.

3.10.2 Interaktion in 50 mM CAPS pH 11

Da sich die Oligomerisierung der *si*-Domäne von *KCNQ3*, insbesondere die des TCC1-Bereichs (Kap. 3.8), bei pH 11 und pH 12 unterscheidet, kann auch ein Einfluss des pH-Wertes auf die Heteromerisierung nicht ausgeschlossen werden. Deswegen wurden die Versuche zur Interaktion der *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* ebenfalls bei pH 11 durchgeführt. Dazu wurden maximal einen Tag alte, in pH 11 umgepufferte *Q3pET30-HA*

Dimere eingesetzt, welche bei isolierter Trennung etwa ein Viertel des Proteins im Ausschlussvolumen aufwiesen (Abb. 3.27 C). Auch in 50 mM CAPS pH 11 (Endkonzentration 1,41 mg/ml) war das Proteingemisch stets klar.

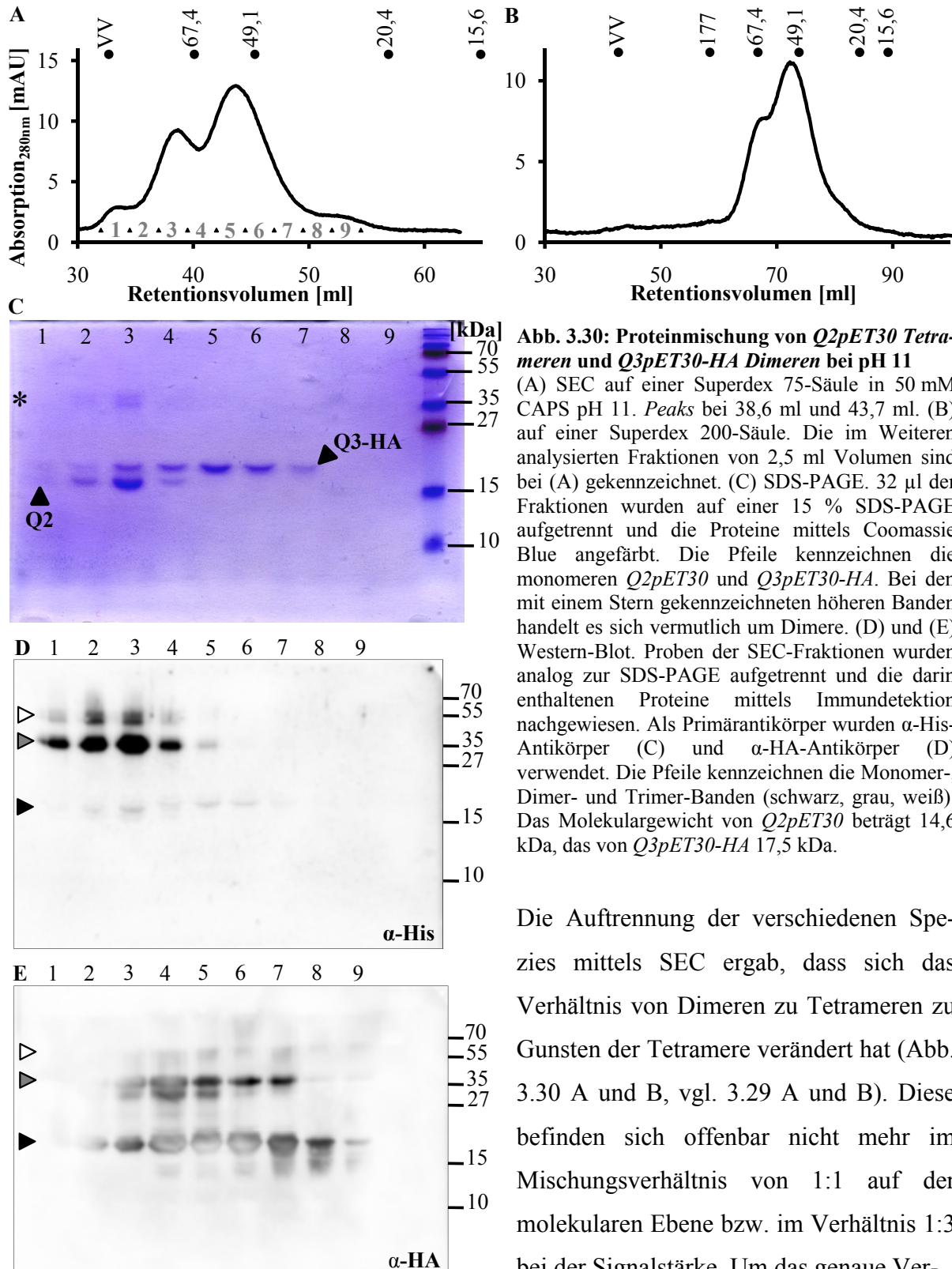


Abb. 3.30: Proteinmischung von *Q2pET30* Tetrameren und *Q3pET30-HA* Dimeren bei pH 11
 (A) SEC auf einer Superdex 75-Säule in 50 mM CAPS pH 11. *Peaks* bei 38,6 ml und 43,7 ml. (B) auf einer Superdex 200-Säule. Die im Weiteren analysierten Fraktionen von 2,5 ml Volumen sind bei (A) gekennzeichnet. (C) SDS-PAGE. 32 µl der Fraktionen wurden auf einer 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Coomassie Blue angefärbt. Die Pfeile kennzeichnen die monomeren *Q2pET30* und *Q3pET30-HA*. Bei den mit einem Stern gekennzeichneten höheren Banden handelt es sich vermutlich um Dimere. (D) und (E) Western-Blot. Proben der SEC-Fractionen wurden analog zur SDS-PAGE aufgetrennt und die darin enthaltenen Proteine mittels Immundetektion nachgewiesen. Als Primärantikörper wurden α-His-Antikörper (C) und α-HA-Antikörper (D) verwendet. Die Pfeile kennzeichnen die Monomer-, Dimer- und Trimer-Banden (schwarz, grau, weiß). Das Molekulargewicht von *Q2pET30* beträgt 14,6 kDa, das von *Q3pET30-HA* 17,5 kDa.

Die Auftrennung der verschiedenen Spezies mittels SEC ergab, dass sich das Verhältnis von Dimeren zu Tetrameren zu Gunsten der Tetramere verändert hat (Abb. 3.30 A und B, vgl. 3.29 A und B). Diese befinden sich offenbar nicht mehr im Mischungsverhältnis von 1:1 auf der molekularen Ebene bzw. im Verhältnis 1:3 bei der Signalstärke. Um das genaue Ver-

hältnis zueinander zu bestimmen, wäre die Berechnung der Integrale nötig, welche aber wegen der Überschneidung der Signale nicht möglich ist.

Außerdem weisen die Chromatographien nur ein kleineres Ausschlussvolumen auf, als nach der Menge an eingesetzten *Q3pET30-HA Dimeren* mit ihrem Anteil an Aggregaten bei diesem pH-Wert zu erwarten gewesen wäre.

Die SEC zeigt wie bei pH 12 zwei *Peaks*. Bei ersterem könnte es sich um ein reines *Q2pET30 Tetramer* (5,04mer) oder ein *Q2pET30/Q3pET30-HA Tetramer* (4,75mer) im Verhältnis 2:2 handeln. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich dabei um zwei übereinander liegende Signale handelt. Das zweite Signal entspricht vermutlich einem *Q3pET30-HA Dimer*, aber wie bei pH 12 können durch das Erwärmen entstandene *Q2pET30 Dimere* nicht ausgeschlossen werden.

Beim Nachweis der Proteine in den einzelnen Fraktionen der Superdex 75-Auftrennung ergab sich ein Bild analog zur Untersuchung bei pH 12. Die Coomassie Blue-Färbung (Abb. 3.30 C) ergab, dass sich in den ersten Fraktionen vermehrt *Q2pET30* findet, mit dem Maximum in der dritten Fraktion. Auch bei pH 11 ist in Fraktion 3 das Verhältnis von *Q2pET30* zu *Q3pET30-HA* deutlich auf Seiten der *si*-Domäne von *KCNQ2*, was für eine Überlagerung zweier tetramerer Spezies spricht.

Q3pET30-HA findet sich bevorzugt in den späteren Fraktionen, am stärksten in Fraktion 5. Diese Verteilung entspricht dem erhaltenen Chromatogramm. Allerdings nimmt in der SDS-PAGE noch deutlicher als bei pH 12 (Abb. 3.29 C) die Menge an *Q3pET30-HA* nicht gleichmäßig zu beiden Seiten des Maximums ab. Es ist in den Fraktionen der größeren Spezies stärker vertreten. In der dritten, Tetramere enthaltenden Fraktion, ist es noch gut sichtbar. Diese Fraktion weist im Übrigen auch die stärksten Dimer-Banden in den Western-Blots auf (Abb. 3.30 D und E).

Bei der Immundetektion ergaben sich nur geringe Unterschiede zu den Proben von pH 12 (Abb. 3.29 D und E). Der Nachweis des His₆-markierten *Q2pET30* (Abb. 3.30 D) zeigt nur eine äußerst schwache Monomer-Bande, während in den ersten vier Fraktionen, welche einem Tetramer in der SEC entsprechen, sich Dimer- und Trimer-Banden nachweisen lassen.

Der Nachweis von *Q3pET30-HA* (Abb. 3.30 E) zeigt deutliche Monomer-Banden, aber auch Dimere und, noch schwächer, Trimere. Das Auftreten größerer Banden ist im Vergleich zum *Q2pET30*-Nachweis bei pH 11 (Abb. 3.29 D) als auch zum *Q3pET30-HA*-Nachweis bei pH 12 (Abb. 3.30 E) zu späteren Fraktionen verschoben.

Um zu überprüfen, ob eine mögliche Wechselwirkung konzentrationsabhängig erfolgt, wurden die Interaktionsversuche bei pH 11 und pH 12 auch mit niedrigeren Endkonzentrationen durchgeführt. Diese ergaben keine in der SEC sichtbaren Unterschiede gegenüber den höheren Proteinmengen.

3.10.3 CD-Spektren der Interaktionsansätze

Sofern eine Interaktion der *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* vorliegt, könnten sich auch Veränderungen in der Struktur und damit in den CD-Spektren der Lösungen ergeben. Dabei unterscheiden sich die Spektren der einzelnen Spezies bei pH 11 und pH 12 nur äußerst geringfügig (Abb. 3.13 B und 3.27 D). Das rechnerische Spektrum ergibt sich als Mittelwert zwischen den beiden normierten Spektren der einzelnen Oligomere, sofern es sich um eine reine 1:1 Mischung handelt und keine Interaktion vorliegt. Abb. 3.31 A zeigt dies stellvertretend für pH 11. Die drei Kurven teilen sich dabei zwangsläufig einen Schnittpunkt.

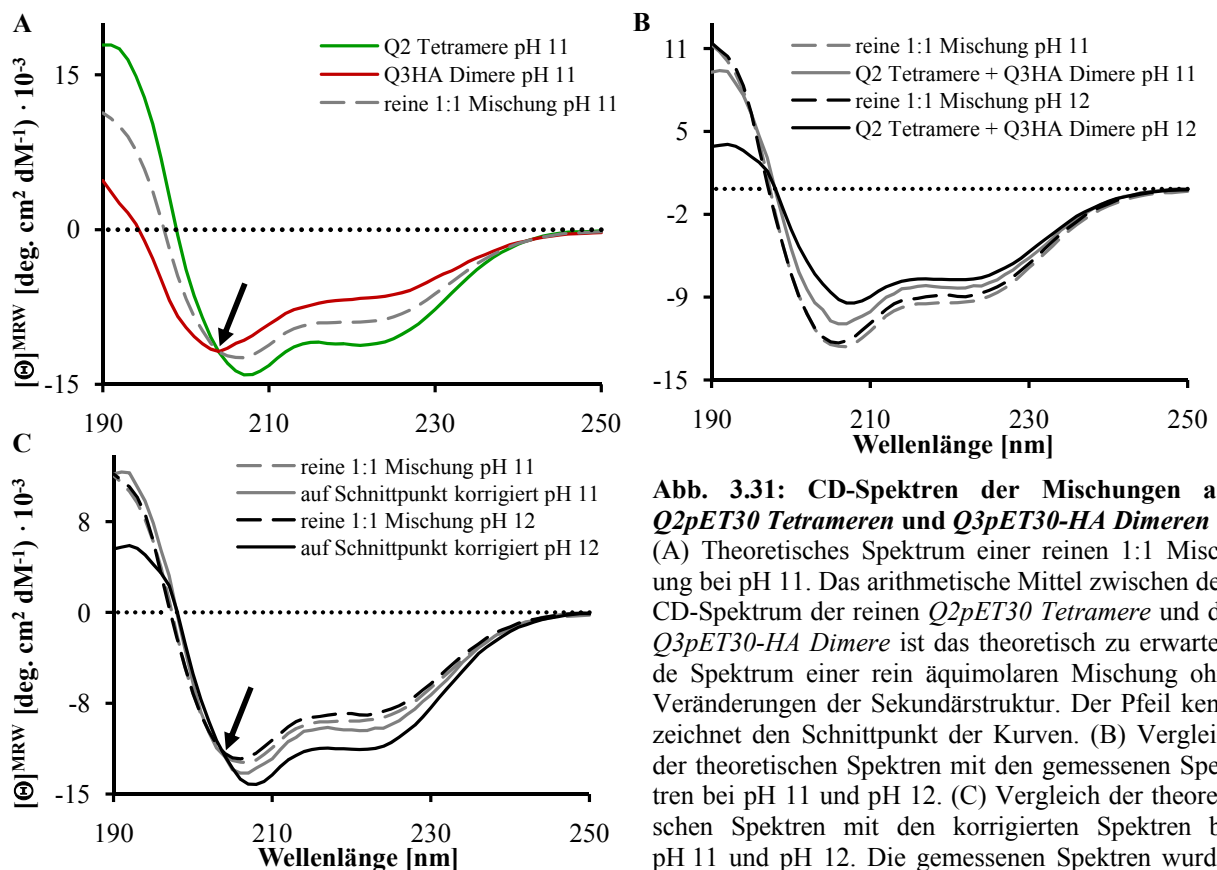


Abb. 3.31: CD-Spektren der Mischungen aus *Q2pET30* Tetrameren und *Q3pET30-HA* Dimeren
 (A) Theoretisches Spektrum einer reinen 1:1 Mischung bei pH 11. Das arithmetische Mittel zwischen dem CD-Spektrum der reinen *Q2pET30* Tetramere und der *Q3pET30-HA* Dimere ist das theoretisch zu erwartende Spektrum einer rein äquimolaren Mischung ohne Veränderungen der Sekundärstruktur. Der Pfeil kennzeichnet den Schnittpunkt der Kurven. (B) Vergleich der theoretischen Spektren mit den gemessenen Spektren bei pH 11 und pH 12. (C) Vergleich der theoretischen Spektren mit den korrigierten Spektren bei pH 11 und pH 12. Die gemessenen Spektren wurden mittels Multiplikation in den in (A) gekennzeichneten Schnittpunkt der einzelnen Oligomere überführt.

Die gemessenen Spektren der gemischten *si*-Domänen verlaufen aber deutlich anders (Abb. 3.31 B), wobei deren Amplitude schwächer als bei den Kurven der einzelnen Proteine ist. Dies könnte auch auf die Erwärmung der Lösung zurückzuführen sein, da zumindest die

einzelnen Oligomere eine Abnahme der Signalstärke, aber keine Veränderung des Kurvenverlaufs, nach 1 Stunde bei 90°C gezeigt haben (Abb. 3.15 C und 3.28 C).

Deswegen wurden die gemessenen Spektren mittels Multiplikation in den bereits angesprochenen Schnittpunkt überführt. Bei pH 11 war die Vervielfachung mit dem Faktor 1,25 und bei pH 12 mit 1,59 nötig. Dieses Vorgehen ist zulässig, weil die Schnittpunkte mit der Nulllinie der gemessenen und der theoretischen Spektren nahe beieinander liegen.

Dennoch zeigen sich immer noch Unterschiede zwischen diesen Spektren. Damit könnte eine Interaktion der beiden *si*-Domänen stattgefunden haben. Dabei verläuft bei pH 11 die korrigierte Kurve wesentlich näher an der theoretischen als bei pH 12. Dort weist das Spektrum nicht nur eine höhere Amplitude auf, es ist auch zu stärker α -helikalen Charakteristika verschoben, sichtbar in der Veränderung des 1. Minimums von 206 nm auf 208 nm. Das Proteingemisch bei pH 12 könnte daher einen höheren Anteil an α -Helices besitzen.

Zusammenfassend ergaben die Versuche zur Interaktion der *Q2pET30 Tetramere* mit *Q3pET30-HA Dimeren* mehrere Hinweise auf die Wechselwirkung der beiden *si*-Domänen:

- Im Western-Blot treten in den Tetramer-Fractionen der SEC größere Spezies auf als in den Fractionen der Dimere.
- Bei pH 11 sinkt der Anteil an Dimeren gegenüber den Tetrameren.
- Dabei ist gleichzeitig das Ausschlussvolumen trotz des in die Probe eingebrachten Anteils an *Q3pET30-HA Aggregaten* geringer als erwartet.
- Die Verteilung von *Q3pET30-HA* in den Fractionen entspricht keinem symmetrischen *Peak*.
- In der CD-Spektroskopie unterscheiden sich die gemessenen Proteinmischungen, insbesondere bei pH 12, von den theoretischen Spektren einer reinen 1:1 Vermengung.

3.11 Molecular Modeling

KCNQ2 und *KCNQ3* können heteromere Kanäle mit charakteristischen Eigenschaften ausbilden (Abb. 1.5), wobei einer potenziellen Interaktion ihrer *si*-Domänen besondere Bedeutung zukommt. Theoretisch gibt es vier Möglichkeiten für deren räumliche Anordnungen (Abb. 3.32). Neben den 1:3- und 3:1-Heteromeren, in denen sich nur eine der vier Untereinheiten von den übrigen unterscheidet, gibt es zwei Möglichkeiten zur Ausbildung einer 2:2 Stöchiometrie. In diesen können gleichartige Untereinheiten entweder nebeneinander oder gegenüberliegend angeordnet sein.

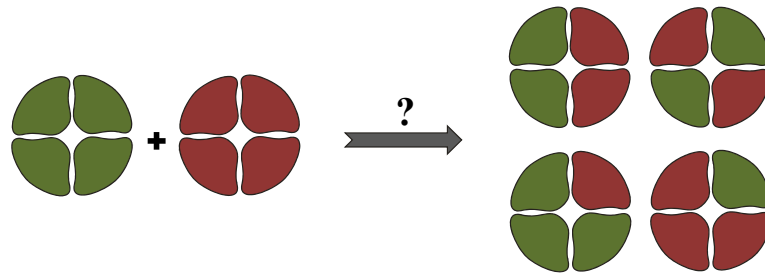


Abb. 3.32: Schematische Darstellung möglicher *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromeren
KCNQ2-Untereinheiten wurden grün, *KCNQ3*-Untereinheiten rot dargestellt.

Da es Hinweise auf ein 1:1 Verhältnis im *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromer gibt (Hadley *et al.*, 2003), wurden mittels *Molecular Modeling* vier Modelle des beschriebenen Bereichs (vgl. Anhang I) für *KCNQ2* und *KCNQ3* erstellt: Zum einen die beiden homomeren *coiled-coil* Strukturen und zum anderen die beiden möglichen 2:2 Anordnungen.

Sofern die *si*-Domänen der beiden Kanäle an dieser Interaktion beteiligt sind, könnten die hydrophoben Wechselwirkungen im Inneren der *coiled-coil* Struktur eine bestimmende Wirkung auf die Anordnung der Untereinheiten haben. Die Erstellung eines dreidimensionalen Modells für die Heteromerisierung könnte somit Hinweise auf die sterischen Grundlagen dafür geben. Als Ausgangspunkt dazu diente ein Abschnitt der TCC2-Region von *KCNQ4* (Abb. 3.33 A), welcher von Howard *et al.* (2007) für *KCNQ4* veröffentlicht wurde (Struktur-Kode der PDB-Datenbank: 2OVC). Diese konnten mittels Kristallstrukturanalyse eine parallele, linksgewunde *coiled-coil* Domäne aus vier Untereinheiten nachweisen, deren α -Helices dabei rechtsgängig waren.



Abb. 3.33: Struktur der TCC2-Domäne der KCNQ-Kanäle

(A) Sequenzalignment: Aminosäuren auf gelbem Hintergrund sind konserviert, wobei die mit Sternchen gekennzeichneten Reste identisch sind. Die Markierung mit einem Doppelpunkt steht für einen konservativen Austausch, während der Punkt schwach konservative Austausche bezeichnet. Die grüne Box zeigt den Bereich von *KCNQ4*, welcher von Howard *et al.* (2007) kristallisiert werden konnte. Dieser umfasst nicht die vollständige TCC2-Domäne (schwarz umklammert). Eine für die Erstellung der Modelle wichtige Phenylalanin-Position in *KCNQ3* ist rot eingekreist. Die Positionen a bis g des *coiled-coil* Motivs sind ebenfalls unter der Sequenz angegeben, wobei die Aminosäurereste der hydrophoben Positionen a in rosa und d in blau wiedergegeben sind. (B) Darstellung der hydrophoben Ebenen im Inneren der *coiled-coil* Struktur. Der in (A) gekennzeichnete Phenylalanin-Rest liegt in der obersten a-Ebene des Modells. Gezeigt sind die Van-der-Waals-Radien der hydrophoben Reste, das α -helikale Peptidrückgrat ist als graues Band dargestellt. Beide Abbildungen wurden Howard *et al.* (2007) entnommen und modifiziert. Die Zählung der Aminosäurereste unterscheidet sich dabei von den in dieser Arbeit verwendeten Sequenzen.

Die Aminosäureseitenketten der α - und δ -Positionen befinden sich dabei im Inneren des Tetrameres und bilden dort hydrophobe Interaktionsebenen aus (Abb. 3.33 B). Diese Positionen sind bei *KCNQ2* und *KCNQ3* bis auf zwei identisch (Abb. 3.33 A). Ein Unterschied betrifft die letzte Aminosäure des kristallisierten Bereichs. Bei *KCNQ2* ist diese ein Tyrosinrest, bei *KCNQ3* ein Histidinrest. Bei der Erstellung der Strukturmodelle spielt diese Position keine Rolle, weil die letzte Aminosäureseitenkette als freies Ende nicht in seiner räumlichen Lage festgelegt werden kann.

Allerdings stellte sich die erste α -Position (Abb. 3.33 A: rot umrandet; B: erste blaue Ebene von oben) als kritisch für die Erstellung der Modelle heraus. Diese ist die neunte Aminosäure der betrachteten Sequenz. Während *KCNQ2*, wie auch *KCNQ1*, einen Leucinrest an dieser Stelle besitzt, ist bei *KCNQ3* dort das wesentlich größere Phenylalanin zu finden. *KCNQ4* und *KCNQ5* weisen hingegen Valinreste auf. Sowohl Valin als auch Leucin sind kleine, hydrophobe Aminosäuren; der Phenylalaninrest hingegen ist als Aromat deutlich größer.

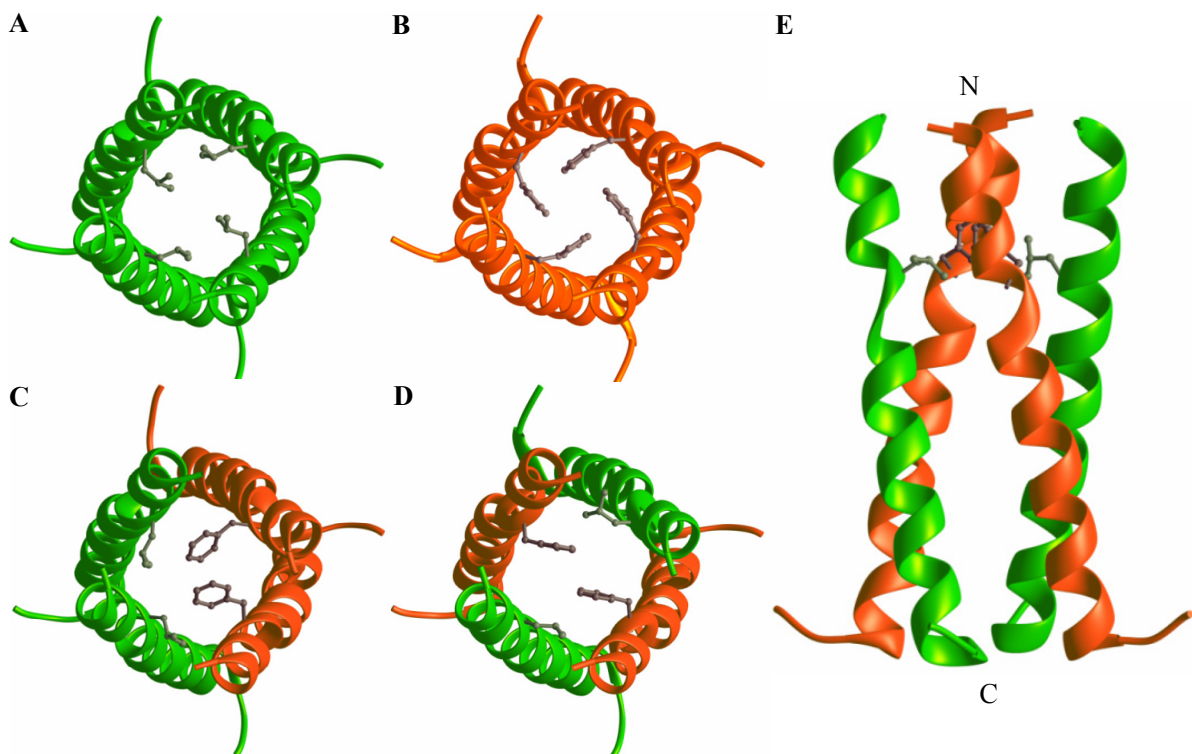


Abb. 3.34: Schematische Darstellung der tetrameren Modelle

(A) Modell der TCC2-Domäne von *KCNQ2*. Blick vom N-Terminus in Richtung des C-Terminus. Während das α -helikale Peptidrückgrat als Band dargestellt ist, sind die Kohlenstoffatome der kritischen α -Position als Strukturformel angegeben. (B) Modell der TCC2 von *KCNQ3*. Hier sind die Phenylalaninreste der α -Position hervorgehoben. (C) Modell des 2:2 Heteromers mit jeweils zwei benachbarten gleichen Untereinheiten von *KCNQ2* und *KCNQ3*. (D) Modell des 2:2 Heteromers mit jeweils zwei gegenüberliegenden gleichen Untereinheiten von *KCNQ2* und *KCNQ3*. (E) Seitliche Darstellung von (D). Der N- und der C-Terminus sind als solche gekennzeichnet. *KCNQ2*-Untereinheiten sind immer grün, *KCNQ3*-Untereinheiten stets rot eingefärbt.

Abb. 3.34 zeigt die energieminierten Modelle. Die Länge der Struktur vom N- zum C-Terminus beträgt etwa $38,7 \text{ \AA} \pm 2,1 \text{ \AA}$ (Abb. 3.34 E), entsprechend der Auflösung von Howard *et al.* (2007). Als äußerer Durchmesser der *coiled-coil* Struktur, gemessen beim c_{α} -Atom des Serins (vierte Aminosäure der betrachteten Sequenz), ergibt sich etwa $19,6 \text{ \AA}$. Der innere Abstand des Rückgrates zwischen den c_{α} -Atomen der neunten Position beträgt beim *KCNQ2 Homomer* etwa $10,4 \text{ \AA}$, beim *KCNQ3 Homomer* etwa $11,1 \text{ \AA}$. Die Differenz dazwischen liegt innerhalb des Fehlers und ist deswegen nicht aussagekräftig.

Bei der Erstellung der Modelle war auffällig, dass es bei der homomeren *KCNQ2*-Struktur (Abb. 3.34 A) an der bereits angesprochenen neunten Position im Gegensatz zum *KCNQ3* deutlich mehr Möglichkeiten zur möglichst ungehinderten Anordnung der Aminosäureseitenketten gab. Beim *KCNQ3*-Modell war eine streng symmetrische Ausrichtung der Aromaten zwingend erforderlich (Abb. 3.34 B). Vor der Energieminimierung traten dabei stets ungünstige Wechselwirkungen zwischen den para-C-Atomen des aromatischen Ringes und dem benachbarten Aromaten auf. Während der Energieminimierung wurde deswegen die Helix an dieser Stelle durch das verwendete Programm erweitert.

Da es bisher keine geeignete theoretische Grundlage zur Berechnung der Affinität gibt, lässt sich keine quantitative Aussage zur Stabilität der berechneten Modelle machen. Festzuhalten bleibt aber, dass der Phenylalanin-Rest in *KCNQ3* einen wesentlich größeren Van-der-Waals Radius hat als Leucin oder Valin. Dadurch kommt es zu ungünstigen sterischen Wechselwirkungen innerhalb des hydrophoben Kerns.

Auch die Strukturmodelle der 2:2-Heteromere enthielten keine offensichtlich unmöglichen Seitenkettenanordnungen. Die räumliche Anordnung der Aminosäureseitenketten an Position 9 ist bei benachbarten gleichen Untereinheiten (Abb. 3.34 C), gegenüberliegenden gleichen Untereinheiten (Abb. 3.34 D) und den in den Homomeren angenommenen Orientierungen leicht unterschiedlich. Dabei ist nicht auszuschließen, dass es bei diesen Modellen noch andere Möglichkeiten zur Anordnung der Aminosäureseitenketten gibt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den heteromeren Modellen weder an der Position 9 noch an anderen a- oder d-Positionen des *coiled-coil* Motivs derart ungünstige Wechselwirkungen auffällig waren, anhand derer sich eines der Heteromere ausschließen ließe. Über die Stabilität der Modelle lässt sich dabei keine Aussage machen.

3.12 Deletion der TCC2-Domäne aus *KCNQ4*

Die Grundlage für die Erstellung eines Strukturmodells des TCC2-Bereichs nach Howard *et al.* (2007) war eine Kristallstrukturanalyse, in welcher diese Domäne von *KCNQ4* eine tetramere *coiled-coil* Struktur ausbildete. Um zu überprüfen, welche Bedeutung dieser Abschnitt für die Funktion von *KCNQ4* hat, wurde er daraus entfernt (vgl. Anhang I) und der deletierte Kaliumkanal in Oozyten untersucht.

Die Deletion der TCC2-Domäne hat keinen Einfluss auf die *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit des TCC1-Bereichs (Abb. 3.35 A). Die Synthese beider *KCNQ4*-Kanäle in Oozyten konnte mittels Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 3.35 B). Dabei erscheint *KCNQ4 del TCC2* nicht wesentlich kleiner als *KCNQ4*, letzteres weist allerdings noch eine schwache, größere Bande auf, bei der es sich um ein Dimer handeln könnte.

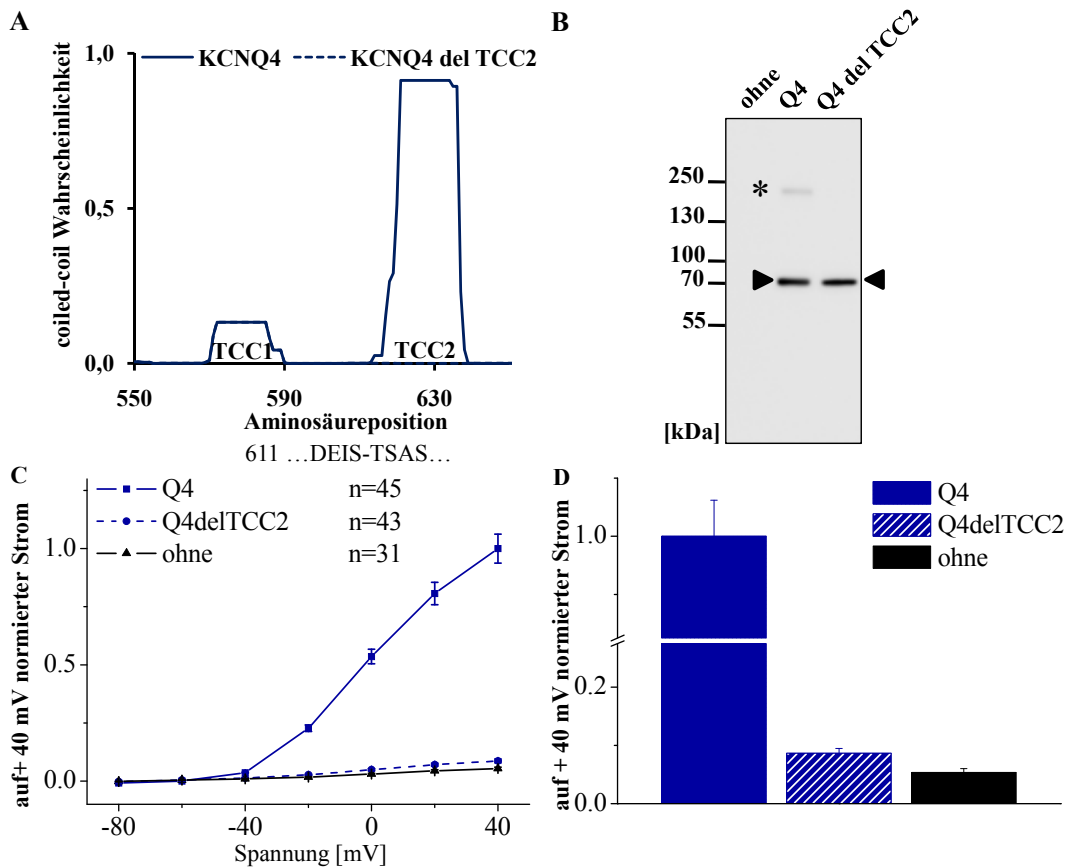


Abb. 3.35: Eigenschaften von *KCNQ4* und *KCNQ4 del TCC2*

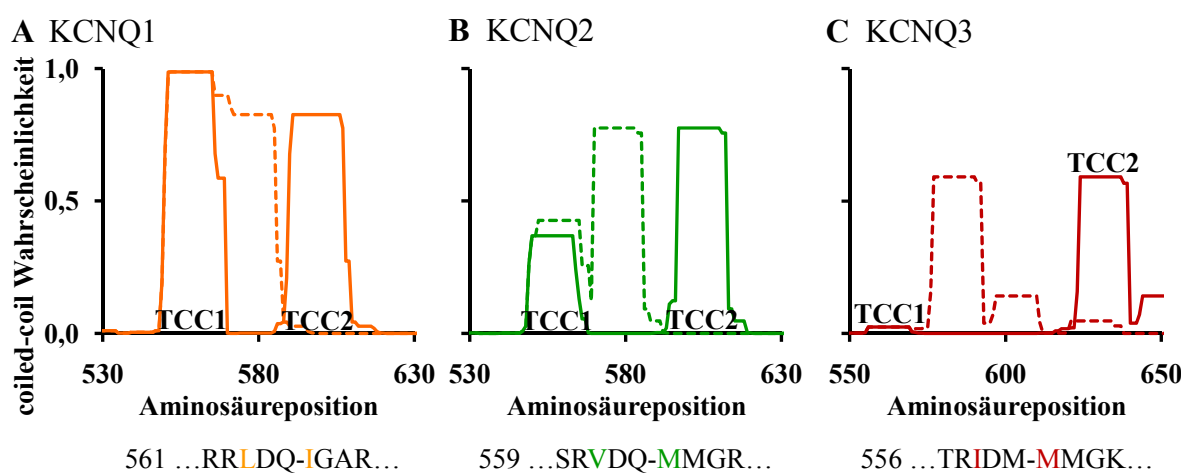
(A) *Coiled-coil* Wahrscheinlichkeiten der in Oozyten analysierten Proteine. Es wurden Fenster von jeweils 14 aufeinander folgenden Aminosäuren analysiert. Der maximale Wert für die TCC1-Domäne beträgt 0,133 und für die TCC2-Region 0,913. Die Positionen von *KCNQ4 del TCC2* beziehen sich auf die des verkleinerten Proteins. Die Wahrscheinlichkeiten beider Proteine überlagern sich bei der TCC1-Domäne, während beim TCC2-Bereich von *KCNQ4 del TCC2* aufgrund der Deletion keine Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer *coiled-coil* Struktur mehr besteht. Somit ist dessen Kurvenverlauf nicht deutlich sichtbar. (B) Western-Blot der Oozyten-Lysate aufgetrennt auf einer 8 % SDS-PAGE. Die Pfeile kennzeichnen die nachgewiesenen Proteine. Die berechneten Molekulargewichte betragen für *KCNQ4* 77,1 kDa und für *KCNQ4 del TCC2* 73,3 kDa. Der Stern kennzeichnet eine Dimer-Bande. In der mit „ohne“ gekennzeichneten Bahn ist Lysat aus nicht transfizierten Eizellen aufgetragen. (C) Strom-Spannungs-Kurve mit n als der Anzahl der gemessenen Oozyten (D) Balkendiagramm. Die Ströme wurden auf den Wert von *KCNQ4* bei +40 mV normiert und die Standardfehler eingezeichnet. Die als „ohne“ bezeichneten Werte beruhen auf Messungen nicht-injizierter Oozyten.

Die elektrophysiologischen Messungen ergaben, dass die Deletion der TCC2-Domäne in *KCNQ4* zu einem fast vollständigen Verlust der gemessenen Ströme führt (Abb. 3.35 C und D). Gegenüber nicht-injizierten Oozyten sind die Ströme nur unwesentlich erhöht (*Q4 del TCC2*: 8,7 %, ohne: 5,4 %). Außerdem unterschied sich das Ruhepotential von *Q4 del TCC2* exprimierenden Oozyten nicht von dem nicht-injizierter Eizellen. *Q4 del TCC2* scheint nicht in die Plasmamembran gelangt zu sein, somit ist die TCC2-Domäne für die Oberflächenexpression von *KCNQ4* notwendig.

3.13 Messung *loop*-deletierter KCNQ-Kanäle in Oozyten

3.13.1 *Coiled-coil* Vorhersage

Der Bereich zwischen den TCC-Domänen stellt eine flexible Verbindung dieser beiden Abschnitte dar. Er könnte eine Interaktion zwischen der TCC1- und der TCC2-Region innerhalb derselben Untereinheit ermöglichen. Außerdem könnte die Schleife (*loop*) zur Oligomerisierung beitragen, da die Doppelmutanten der *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* mit gestörter Sekundärstruktur beider TCC-Domänen noch Dimere ausbilden (Kap. 3.4.1 und 3.7.4).



D

Protein	coiled-coil Wahrscheinlichkeit	
	TCC1	TCC2
Q1	0,988	0,827
Q1 del Loop	0,988	0,827
Q2	0,369	0,776
Q2 del Loop	0,427	0,776
Q3	0,024	0,592
Q3 del Loop	0,024	0,592

Abb. 3.36: *Coiled-coil* Wahrscheinlichkeiten von Wildtyp und *loop*-deletierten KCNQ-Kanälen

(A), (B) (C): Grafische Darstellung der *coiled-coil* Domänen. Die Wildtyp-Kanäle sind als durchgängige Linie, die *loop*-deletierten gestrichelt wiedergegeben. Die TCC-Domänen der Wildtyp-Proteine sind zur besseren Identifizierung gekennzeichnet. Die Positionen der veränderten Kanäle beziehen sich auf die der *loop*-deletierten Proteine. Dadurch entsteht in dieser Art der Darstellung eine Linksverschiebung der Wahrscheinlichkeiten nach der TCC1-Domäne gegenüber dem Wildtyp. Die Fusionsstelle ist als Bindestrich in der Aminosäuresequenz dargestellt. Die a- und d-Positionen sind farblich gekennzeichnet. (D) Maximale *coiled-coil* Wahrscheinlichkeiten der in Oozyten analysierten Proteine. Es wurden dabei Fenster von jeweils 14 aufeinanderfolgenden Aminosäuren analysiert.

Um dies zu überprüfen, wurden die Schleifen aus *KCNQ1*, *KCNQ2* und *KCNQ3* entfernt und die TCC-Domänen fusioniert. Die Deletion erfolgte dabei unter der Berücksichtigung des *coiled-coil* Motivs. Um ein über die beiden TCC-Domänen durchgängiges Muster zu erhalten, wurde jeweils die letzte Aminosäure der TCC1-Region (welche einer a-Position zugeordnet werden kann) über die beiden N-terminalen Aminosäurereste der Schleife mit der ersten Position des TCC2-Bereichs verbunden (welche einer d-Position entspricht, Abb. 3.36 A bis C, vgl. Anhang I).

Die Entfernung der Schleife bringt die beiden TCC-Domänen in unmittelbare Nachbarschaft. Dadurch verändert sich deren jeweilige Umgebung, was einen Einfluss auf ihre *coiled-coil* Wahrscheinlichkeiten ausüben kann. Dies zeigt sich z.B. in dem erhöhten Wert der TCC1-Domäne von *Q2 del Loop* gegenüber dem Wildtyp (Abb. 3.36 D). Die erhaltenen Wahrscheinlichkeiten berücksichtigen im Gegensatz zu den bisherigen Experimenten mit isolierten *si*-Domänen auch deren Umgebung in der KCNQ-Untereinheit. Bei den übrigen TCC-Domänen ändert die Deletion der Schleife die *coiled-coil* Vorhersagen nicht in ihrer maximalen Größe.

Allerdings ergibt sich für *Q1 del Loop* (Abb. 3.36 A) zwischen den fusionierten TCC-Domänen eine durchgehend hohe *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit, während bei *Q2 del Loop* (Abb. 3.36 B) der Wert zwischen den Kurven absinkt. Bei *Q3 del Loop* (Abb. 3.36 C) ist die Wahrscheinlichkeit der TCC1-Domäne so gering, dass über den Übergang zur TCC2-Region keine Aussage gemacht werden kann. Außerdem ist offensichtlich, dass es in der Vorhersage für die C-terminale Region (CTR) von *KCNQ3* noch weitere Bereiche mit geringer *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit gibt, für die bisher keine Funktion beschrieben ist.

3.13.2 Loop-Deletion in *KCNQ1*

Um Aussagen über die von Kanälen ohne Schleife verursachten Ströme machen zu können, musste zunächst deren Expression nachgewiesen werden. Nach der Injektion entsprechender cRNA in Oozyten und dreitägiger Inkubationszeit wurde die Anwesenheit von KCNQ-Kanälen mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme und Western-Blot analysiert.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen ergaben, dass die Deletion der Schleife in *Q1 del Loop* zum vollständigen Verlust der gemessenen Ströme führt (Abb. 3.37 A). Dabei sind auch bei der höchsten angelegten Spannung von +40 mV keine Unterschiede gegenüber nicht-injizierten Oozyten festzustellen (Abb. 3.37 B).

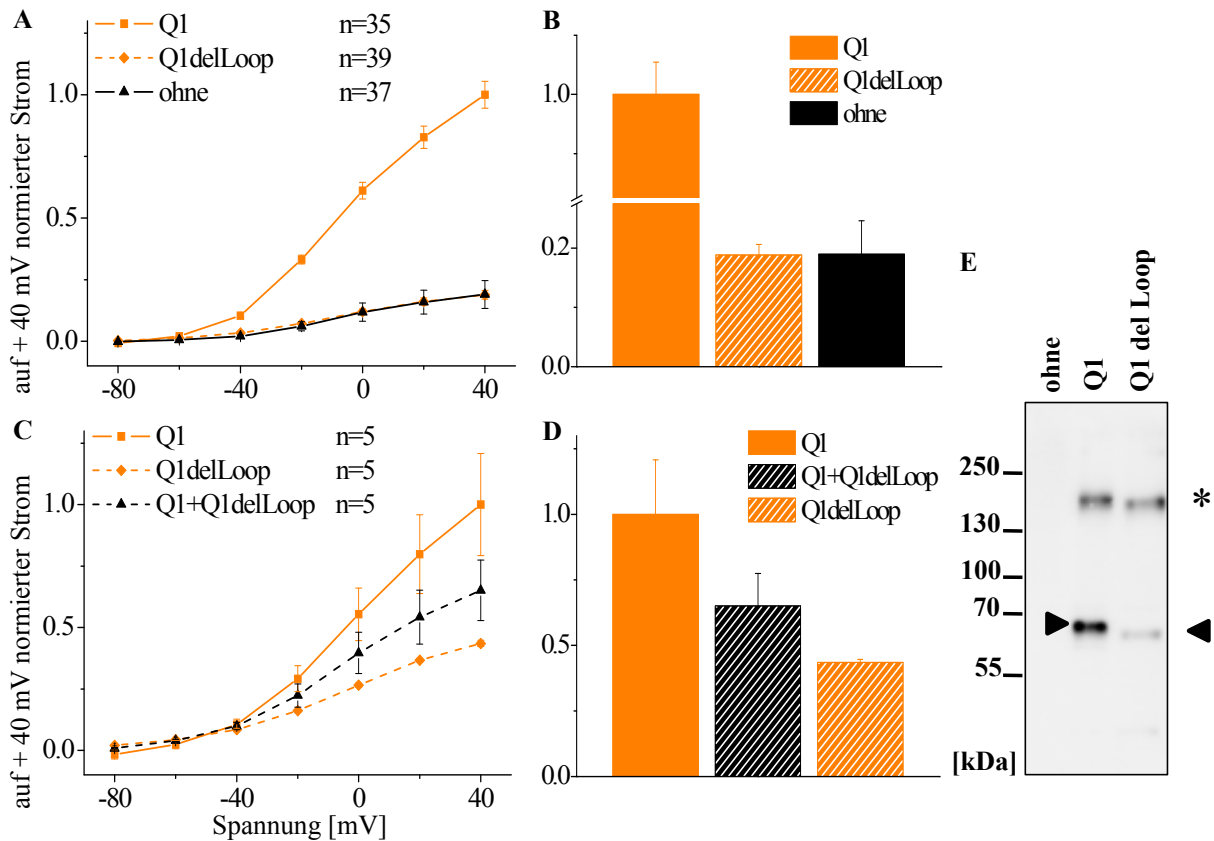


Abb. 3.37: Elektrophysiologische Messungen und Nachweis von *KCNQ1* und *KCNQ1 del Loop*
 (A) und (C) Strom-Spannungs-Kurve mit n als der Anzahl der gemessenen Oozyten (B) und (D) Balkendiagramm. Die Ströme wurden auf den Wert von *KCNQ1* bei +40 mV normiert und die Standardfehler eingezeichnet. Die als „ohne“ bezeichneten Werte beruhen auf Messungen nicht-injizierter Oozyten. (E) Western-Blot von Oozyten-Lysaten aufgetrennt auf einer 8 % SDS-PAGE. Die Pfeile markieren die nachgewiesenen Proteine. Das berechnete Molekulargewicht beträgt bei *KCNQ1* 74,7 kDa, bei *Q1 del Loop* 72,4 kDa. Potenzielle Dimerbanden sind mit einem Stern gekennzeichnet. In der mit „ohne“ beschrifteten Bahn ist Lysat aus nicht transfizierten Eizellen aufgetragen.

Um zu überprüfen, ob der Verlust der Schleife durch Wildtyp-Untereinheiten kompensiert werden kann, wurden *KCNQ1* und *Q1 del Loop* in einem ersten Versuch gemeinsam injiziert. Der resultierende Strom der Koexpression lag zwischen denen der Einzel-Expressionen (Abb. 3.37 C). Der Vergleich der Ströme bei +40 mV ergab für *Q1 del Loop* etwa 44 % des *KCNQ1*-Stromes, für die Koexpression rund 65 % der Wildtyp-Amplitude (Abb. 3.37 D). Ob letztere von homo- oder heteromeren Kanälen verursacht werden, wird in der Diskussion geklärt.

Der immuniologische Nachweis beider *KCNQ1*-Kanäle (Abb. 3.37 E) weist neben den monomeren Banden noch Signale mit höherem Molekulargewicht auf, bei welchen es sich um dimere Spezies handeln könnte. Auch die durch die Deletion verringerte Größe gegenüber den Wildtyp-Proteinen zeigt sich in einer Verschiebung der Signale zu kleineren Molekulargewichten.

Die Analyse der Oozyten-Lysate im Western-Blot weist lediglich die Expression von *KCNQ*-Proteinen, nicht deren Lokalisation in der Oberflächenmembran der Eizelle nach. Allerdings führten beide Kaliumkanäle zu Ruhepotentialen, die unter -50 mV und damit deutlich unter dem Wert der nicht-injizierten Oozyten lagen. Dieser in die Richtung des Gleichgewichtspotenzials von Kaliumionen verschobene Wert legt nahe, dass sich zumindest ein Teil der Ionenkanäle in der Oozytenmembran befinden.

3.13.3 Loop-Deletion in *KCNQ2*

Im Gegensatz zu *KCNQ1* führte bei *KCNQ2* die Entfernung der Schleife nicht zum vollständigen Verlust der Ströme. *Q2 del Loop* verursacht noch etwa 73 % des *KCNQ2*-Stromes, wobei sich die Fehlerbereiche beider Messungen bei Spannungen ab -40 mV nicht mehr überschneiden (Abb. 3.38 A).

Auffällig ist, dass bei der Koexpression von *KCNQ2* mit *Q2 del Loop* der mittlere Strom die Wildtyp-Amplitude um etwa 20 % übersteigt. Hier überschneiden sich allerdings die Fehlerbereiche beider Messungen teilweise (Abb. 3.38 A und B).

Da die von *KCNQ2* verursachten Ströme absolut größer sind als die von *KCNQ1*, erscheinen im Vergleich die Ströme nicht-injizierter Oozyten bei *KCNQ2* (Abb. 3.38 B) deutlich kleiner als bei *KCNQ1* (Abb. 3.37 B).

Der Nachweis von *KCNQ2*-Kanälen im Western-Blot zeigt breite Signale und etwas Hintergrund (Abb. 3.38 C). Die Signale weisen auch eine bereits angesprochene Verschiebung aufgrund der Deletion auf.

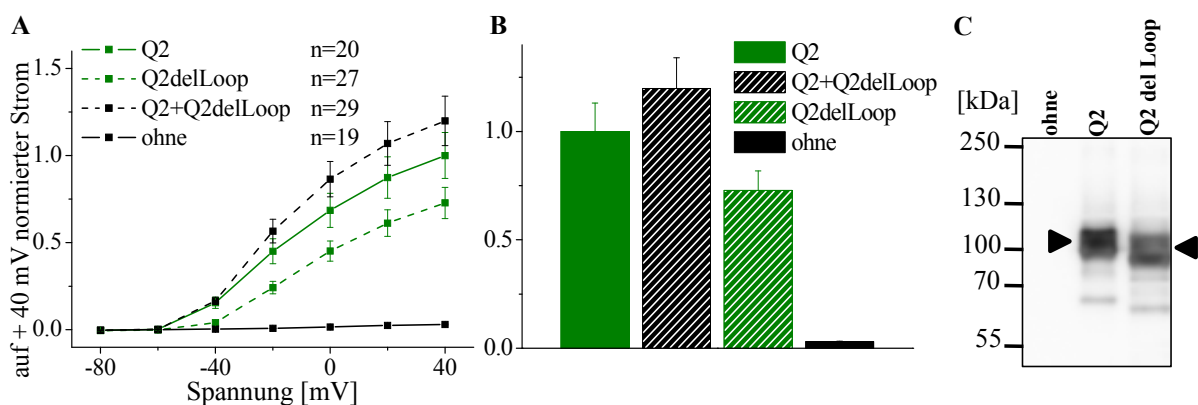


Abb. 3.38: Elektrophysiologische Messungen und Nachweis der *KCNQ2*-Kanäle

(A) Strom-Spannungs-Kurven mit n als der Anzahl der gemessenen Oozyten. (B) Balkendiagramm. Die Ströme wurden auf den Wert von *KCNQ2* bei +40 mV normiert und die Standardfehler eingezeichnet. Die als „ohne“ bezeichneten Werte beruhen auf Messungen nicht-injizierter Oozyten. (C) Western-Blot von Oozyten-Lysaten aufgetrennt auf einer 8 % SDS-PAGE. Die Pfeile markieren die nachgewiesenen Proteine. Die berechneten Molekulargewichte betragen *KCNQ2* 93,1 kDa und *Q2 del Loop* 90,3 kDa. In der mit „ohne“ beschrifteten Bahn ist Lysat aus nicht transfizierten Eizellen aufgetragen.

3.13.4 Loop-Deletion in *KCNQ3*

Die Deletion der Schleife führte bei *KCNQ3* zu einer fast vollständigen Reduzierung des Stromes auf 34 % der Wildtyp-Amplitude, und liegt damit leicht über dem Wert von 23 % für nicht-injizierte Oozyten (Abb. 3.39 A und B). Die Ströme der Koexpression von *KCNQ3* mit *Q3 del Loop* zeigten eine Strom-Spannungskurve, die zwischen denen der Einzelexpressionen lag. Die Ströme bei +40 mV betragen wie bei *KCNQ1* (Abb. 3.37 C) etwa 65 % der Wildtyp-Amplitude.

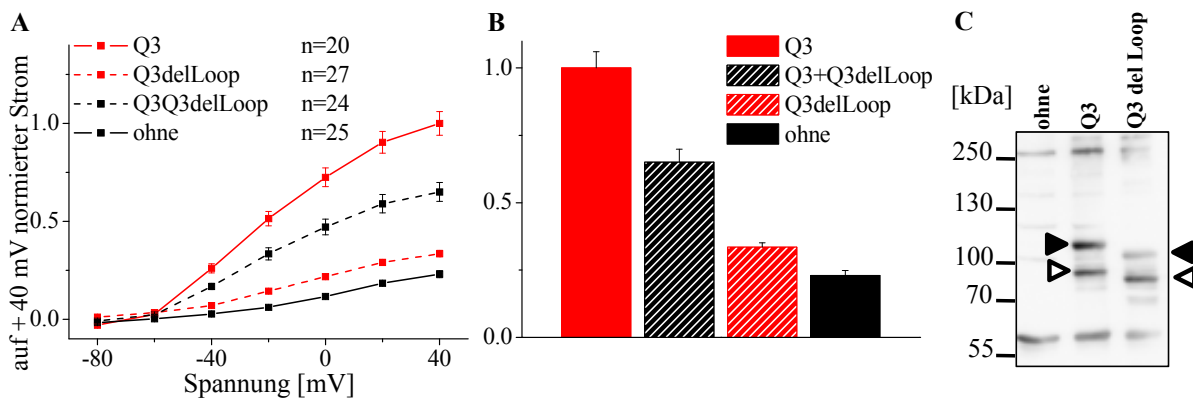


Abb. 3.39: Elektrophysiologische Messungen und Nachweis der *KCNQ3*-Kanäle

(A) Strom-Spannungskurven mit n als der Anzahl der gemessenen Oozyten. (B) Balkendiagramm. Die Ströme wurden auf den Wert von *KCNQ3* bei +40 mV normiert und die Standardfehler eingezeichnet. Die als „ohne“ bezeichneten Werte beruhen auf Messungen nicht-injizierter Oozyten. (C) Western-Blot von Oozyten-Lysaten aufgetrennt auf einer 8 % SDS-PAGE. Die Pfeile markieren die nachgewiesenen Proteine. Die berechneten Molekulargewichte betragen *KCNQ3* 96,7 kDa und *Q3 del Loop* 91,6 kDa. In der mit „ohne“ beschrifteten Bahn ist Lysat aus nicht transfizierten Eizellen aufgetragen.

Die beiden *KCNQ3*-Kanäle wurden mittels polyklonalen Antikörpern nachgewiesen (Abb. 3.39 C). Die Negativkontrolle weist dabei wenige Banden auf, welche sich auch in den Proben transfizierter Oozyten wiederfinden. Um den 100 kDa Größenstandard finden sich aber jeweils zwei Signale, welche offenbar von *KCNQ3*-Kanälen stammen.

Mit *Q3 del Loop* injizierte Oozyten wiesen, wie die beiden anderen Kanäle ohne Schleife, ein Ruhepotential kleiner als -50 mV auf, so dass von einer teilweisen Lokalisation in der Plasmamembran ausgegangen werden kann.

3.13.5 Loop-deletierte *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromere

Wie bereits beschrieben (Kap. 1.2.4) können *KCNQ2* und *KCNQ3* heteromere Kanäle mit veränderten Eigenschaften gegenüber den Homomeren ausbilden. Um die Bedeutung der Schleife zwischen den TCC1- und den TCC2-Domänen zu untersuchen, wurden Koexpressionen *loop*-deletierter Kanäle durchgeführt.

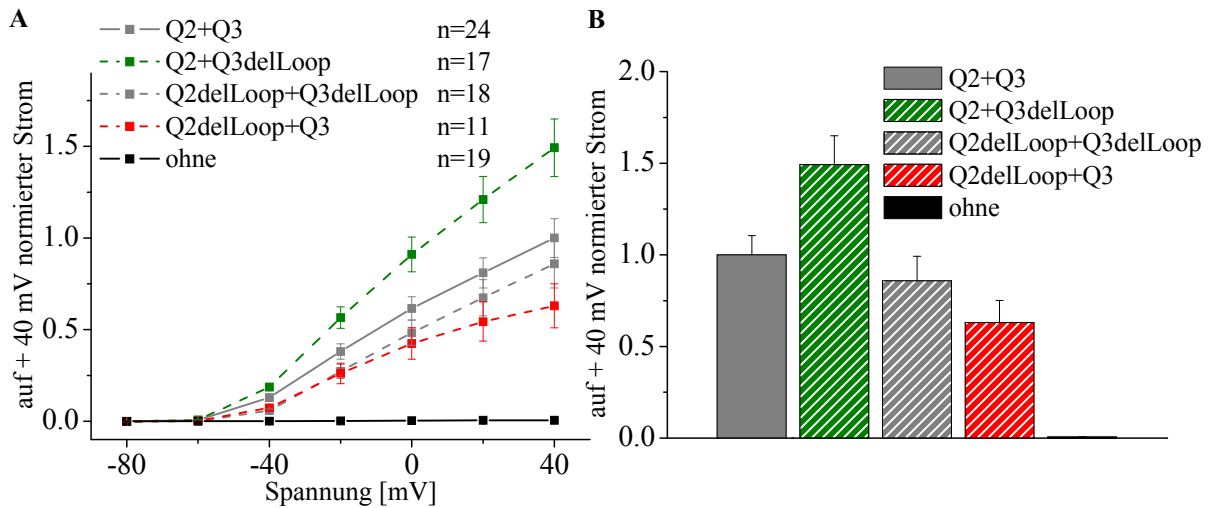


Abb. 3.40: Elektrophysiologische Messungen *loop*-deletierter und Wildtyp *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromere (A) Strom-Spannungs-Kurve mit *n* als der Anzahl der gemessenen Oozyten (B) Balkendiagramm. Die Ströme wurden auf den Wert von *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromeren bei +40 mV normiert und die Standardfehler eingezeichnet. Die als „ohne“ bezeichneten Werte beruhen auf Messungen nicht-injizierter Oozyten.

Die Koexpression (Abb. 3.40 A) von *Q2 del Loop* mit *Q3 del Loop* ergab einen gegenüber den Wildtyp-Heteromeren leicht erniedrigten Strom (etwa 86 % bei +40 mV). Im Gegensatz dazu verursacht die gemeinsame Expression von *Q2 del Loop* mit *KCNQ3* einen deutlich geringeren als den Heteromeren-Strom (rund 63 % bei +40 mV). Dies steht im Kontrast zur Koexpression von *KCNQ2* mit *Q2 del Loop*, bei welcher die Anwesenheit von *Q2 del Loop* zu einer Erhöhung der Ströme gegenüber dem *KCNQ2*-Wildtyp führte (Abb. 3.38 A). Hingegen führt die gemeinsame Expression von *Q3 del Loop* mit *KCNQ2* zu einem mit 49 % wesentlich erhöhten Strom.

Abb. 3.40 B gibt diese Verhältnisse nochmal bei der höchsten angelegten Spannung wieder. Die Ströme der nicht-injizierten Oozyten sind wegen ihrer verhältnismäßig geringen Amplitude nicht mehr zu erkennen.

Die Vervielfachung der Amplitude um das 8- bis 10-fache ist das auffälligste Kennzeichen der *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromeren. Dies ermöglicht die Unterscheidung von Strömen, welche von homo- oder heteromeren Kanälen bei der Koexpression von *KCNQ2*- und *KCNQ3*-Konstrukten verursacht werden, sofern deren absolute Werte nicht zu stark in die Nähe der homomeren Kanäle sinken.

Abb. 3.41 zeigt die typische Stromverstärkung anhand von Einzelmessungen. Somit ist davon auszugehen, dass die Koinjektion von cRNA auch zu einer Koexpression von *KCNQ2*- und *KCNQ3*-Kanälen führte.

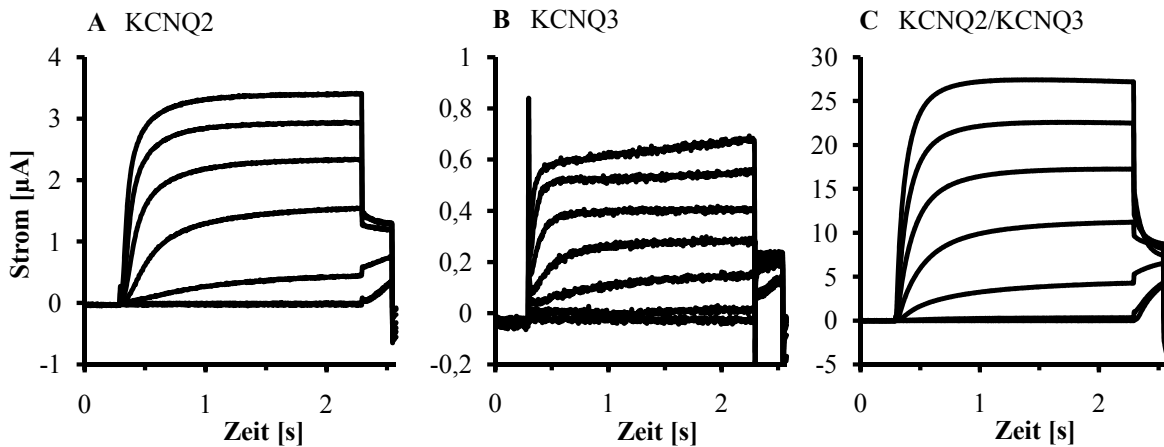


Abb. 3.41: Einzelmessungen von (A) *KCNQ2*, (B) *KCNQ3* sowie (C) *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromeren
 Alle Abbildungen weisen eine unterschiedliche Skalierung auf.

Aufgrund der Tatsache, dass die Ströme der Koexpressionen im Vergleich zu den der Wildtyp-Heteromere um maximal 47 % (*Q2 del Loop* mit *KCNQ3*) sinken und damit die Ströme der homomeren Kanäle immer noch um ein Vielfaches übersteigen, ist davon auszugehen, dass alle gemessenen Ströme von heteromeren Kanälen verursacht wurden.

3.14 Messung von *KCNQ2* Split-Konstrukten in Oozyten

Da die *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit in *Q2 del Loop* zwischen den beiden TCC-Domänen absinkt (Abb. 3.36 B), ergibt sich die Möglichkeit, dass diese beiden Bereiche aufgrund einer eventuellen Rest-Flexibilität miteinander interagieren könnten. Um eine derartige Wechselwirkung unter Berücksichtigung des gesamten Kanals zu untersuchen, wurden die Ströme zweigeteilter *KCNQ2*-Kanäle in Oozyten gemessen.

Dazu wurden bestehende Konstrukte genutzt (Abb. 3.42), deren Interaktion mit *KCNQ3* bereits in Schwake *et al.* (2006) ausführlich untersucht wurde. Diese konnten seinerzeit keine funktionellen Kanäle bei der Koexpression von *Q2-TCC1-X* und *TCC2-CT-Q2* nachweisen, wobei die cRNA im Konzentrationsverhältnis von 1:1 eingesetzt wurde.

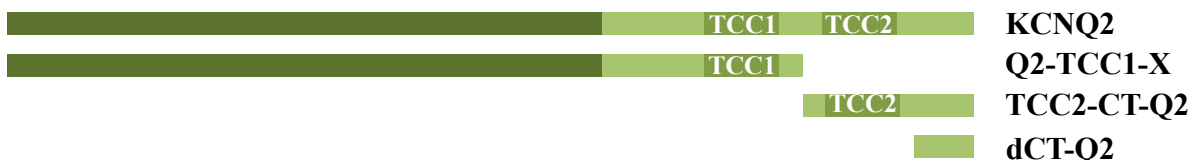


Abb. 3.42: Schematische Darstellung der *KCNQ2*-Teilproteine

Die CTR ist hellgrün gefärbt, während der davor gelegene Bereich dunkelgrün ist. Die beiden TCC-Domänen sind olivgrün abgesetzt. Zum besseren Vergleich ist auch das vollständige *KCNQ2* dargestellt. *Q2-TCC1-X* enthält den Anteil vom N-Terminus bis zur Aminosäure 579, gelegen in der Mitte der Schleife zwischen TCC1 und TCC2. *TCC2-CT-Q2* enthält die CTR ab Aminosäure 580 bis zum Ende des Proteins und beinhaltet daher die TCC2. Das Plasmid *dCT-Q2* dient zur Kontrolle und kodiert die CTR ab zwei Aminosäuren hinter der TCC2. Die Abbildung ist nicht maßstabsgerecht.

Die Trennung in unabhängige *KCNQ2*-Teilproteine erfolgte in der Schleife zwischen der TCC1- und der TCC2-Domäne. Das Plasmid *Q2-TCC1-X* kodiert dabei für ein membranständiges Protein, welches die TCC1-Region beinhaltet. Dieses ergänzt sich theoretisch mit *TCC2-CT-Q2*, welches den TCC2-Bereich und die restlichen CTR enthält, zu einem vollständigen *KCNQ2*-Protein. Das Protein *TCC2-CT-Q2* ist wie *dCT-Q2* vermutlich löslich. Das Konstrukt *dCT-Q2* enthält dabei keine TCC2-Domäne und dient als Negativkontrolle. Die genauen Trennstellen sind in Anhang I eingezeichnet.

Abb. 3.43 zeigt zunächst, dass die Teilproteine *Q2-TCC1-X*, *TCC2-CT-Q2* und *dCT-Q2* alleine nicht in der Lage sind, einen mit *KCNQ2* vergleichbaren Strom zu verursachen. Allerdings ergibt auch keine der durchgeführten Koexpression eine mit dem Wildtyp vergleichbare Messung.

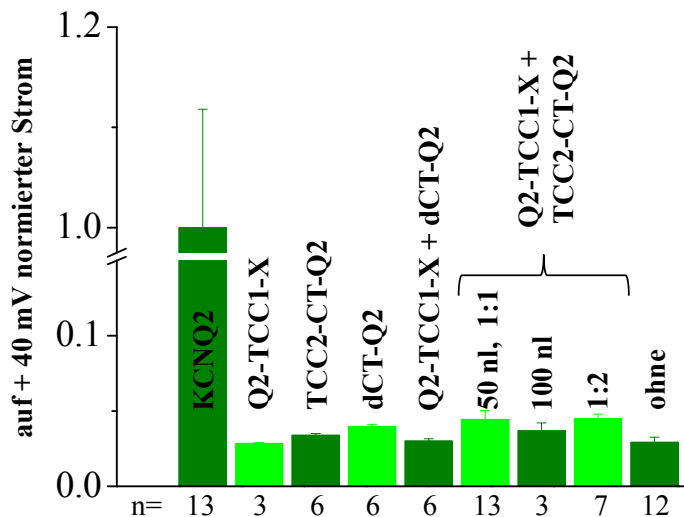


Abb. 3.43: Elektrophysiologische Messungen von *KCNQ2* und dessen Teilproteinen

Balkendiagramm mit n als der Anzahl der gemessenen Oozyten. Die Ströme wurden auf den Wert von *KCNQ2* bei +40 mV normiert und die Standardfehler eingezeichnet. Die als „ohne“ bezeichneten Werte beruhen auf Messungen nicht-injizierter Oozyten.

Dabei wurde die cRNA im Gegensatz zu Schwake *et al.* (2006) bei der Koexpression von *Q2-TCC1-X* mit *TCC2-CT-Q2* im molaren Verhältnis von 1:1 und 1:2 eingesetzt. Auch die versuchsweise Injektion von 100 nl statt 50 nl cRNA im Verhältnis 1:1 führte zu keinen messbaren Strömen. Die maximalen Amplituden der Koexpressionen liegen dabei im Bereich der Messungen von Einzelinjektionen. Die Negativkontrolle (*Q2-TCC1-X* mit *dCT-Q2*) und die nicht-injizierten Oozyten verursachen dabei ein vergleichbares Signal.

Somit konnte keine Interaktion zwischen der TCC1- und der TCC2-Domäne von *KCNQ2* mit diesem Ansatz nachgewiesen werden. Auf die Untersuchung von zweigeteilten *KCNQ3*-Kanälen wurde wegen der geringen Amplitude der Wildtyp-Ströme (Abb. 3.42 B) verzichtet.

4 Diskussion

Die N-terminale T1-Domäne der *Shaker*-Kaliumkanäle (Li *et al.*, 1992) bildet Tetramere aus (Pfaffinger & DeRubeis, 1995). Da diese Domäne die bislang am besten charakterisierte, mutmaßliche Tetramersisierungsdomäne von spannungsabhängigen Kaliumkanälen darstellt, bietet sich die vergleichende Diskussion der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zu dieser und zur Assemblierung anderer spannungsabhängiger Kaliumkanäle an.

T1-Domänen sind für verschiedene Kaliumkanäle beschrieben worden (Covarrubias *et al.*, 2008). KCNQ-Kanäle enthalten keine derartige Domäne, bei ihnen ist die C-terminale Region (CTR) zur Assemblierung der Untereinheiten notwendig (Biervert *et al.*, 1998; Schwake *et al.*, 2000; Schmitt *et al.*, 2000). Dabei spielt die darin identifizierte *si*-Domäne eine entscheidende Rolle (Schwake *et al.*, 2003, Maljevic *et al.*, 2003).

4.1 Die isolierten *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3*

4.1.1 Gewinnung isolierter *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* in *E. coli*

Die T1-Domäne nimmt den Großteil der N-terminalen Region (NTR) der *Shaker*-Kanäle ein. Für deren Strukturanalyse haben Kreuzsch *et al.* (1998) die isolierte Domäne in *E. coli* exprimiert, denaturiert über Nickel-Agarose aufgereinigt und renaturiert. Bei der Herstellung der isolierten *si*-Domänen in dieser Arbeit wurde diese Methode ebenfalls verwendet.

Grundsätzlich unterscheiden sich prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme in ihren posttranslationalen Veränderungen. Da für die *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* keine posttranslationale Modifikationen bekannt sind und diese durch die Abwesenheit von Cysteinen in diesem Bereich keine Disulfidbrücken ausbilden können, war die Verwendung eines prokaryotischen Systems zur Gewinnung der *si*-Domänen ausreichend.

Die Renaturierung von Proteinen ist häufig problematisch (Cabrita & Bottomley, 2004; Singh & Panda, 2005). Da sie nur empirisch durchgeführt werden kann, ist sie arbeits- und kostenaufwändig. Weiterhin muss nach der Renaturierung der Proteine ihre native Konformation überprüft werden. Die Dialyse der denaturierten *si*-Domänen von *KCNQ2* in CAPS-Puffer pH 11 und der von *KCNQ3* bei pH 12 führte zu Proteinlösungen, deren durch CD-Spektroskopie bestimmte Faltung, insbesondere der Anteil der α -Helices, gut mit der Sekundärstrukturvorhersage für die Wildtyp-Domäne übereinstimmte. Die *si*-Domänen waren somit nativ und konnten für weitere Analysen verwendet werden.

4.1.2 Die isolierte *si*-Domäne von *KCNQ2* als Tetramerisierungsdomäne

Der erste Nachweis, dass die NTR von *Shaker* Tetramere ausbildet, erfolgte durch Pfaffinger & DeRubeis (1995) mittels Größenausschlusschromatographie (SEC). Auch die isolierten *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* wurden mit dieser Methode untersucht.

Die Bestimmung der Anzahl der Untereinheiten in den spezifischen Oligomeren erfolgte über die Berechnung von Eichgeraden mit Standardproteinen. Dabei liegt das native Protein oder Oligomer in der Lösung in seiner Hydrathülle vor, wobei die unterschiedliche Form der Standardproteine von entscheidender Bedeutung ist (Goetz *et al.*, 2004). Es kommt also zu einer proteinabhängigen Differenz zwischen tatsächlichem und scheinbarem Molekulargewicht (vgl. Tab. 3.2). Zumindest in einem Fall haben sich die in dieser Arbeit verwendeten Proteine empfindlich gegenüber dem verwendeten, stark basischen pH-Wert gezeigt, indem eine Denaturierung des Standardproteins Albumins bei pH 12 aufgetreten ist.

Darüber hinaus haben die zur Auftrennung der Proteine in der SEC verwendeten Säulen einen optimalen Bereich, außerhalb dessen kein lineares Verhältnis von Retentionsvolumen zum Molekulargewicht besteht (Handbuch des Herstellers Amersham Pharmacia, USA). Daher ist eine gewisse Ungenauigkeit bei der Bestimmung nicht nur möglich, sondern auch zu erwarten.

Die Ergebnisse der SEC suggerierten zunächst das Vorliegen eines rechnerischen Pentamers bei der isolierten *si*-Domäne von *KCNQ2*. Da die Berechnung der Anzahl der Untereinheiten bei dessen Mutanten mit gestörter TCC2-Domäne in etwa eine Halbierung der Größe gezeigt hat, ist anzunehmen, dass es sich bei diesen um Dimere bzw. bei der Wildtyp-Domäne um Tetramere handelt, deren scheinbare Größe größer als ihre tatsächliche Größe ist. Dieses stände im Einklang mit der gut gesicherten Assemblierung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle aus vier Untereinheiten (Jiang *et al.*, 2003a). Zudem sind bisher keine hexameren *coiled-coil* Strukturen beschrieben worden (vgl. Lupas & Gruber, 2005; Parry *et al.*, 2008; Grigoryan & Keating, 2008). Howard *et al.* (2007) konnten mittlerweile einen Bereich der TCC2-Domäne von *KCNQ4* bzw. Wiener *et al.* (2008) von *KCNQ1* kristallisieren. In beiden Fällen ergab sich eine tetramere *coiled-coil* Struktur. Daher kann davon ausgegangen werden, dass auch die isolierte *si*-Domäne von *KCNQ2* ein Tetramer ausbildet.

Die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung zeigen darüber hinaus, dass die Tetramere keine starre, einheitliche Konformation einnehmen, sondern offenbar flexibel sind, wobei anzunehmen ist, dass die ungeordnete Schleife wesentlich dazu beiträgt. Der ermittelte hydrodynamischen Radius der unmarkierten *si*-Domäne von $6,34 \pm 0,39$ nm ist mit der zu erwartenden Größe vereinbar: Theoretisch entspricht eine Windung einer α -Helix einer Länge von

0,54 nm (Löffler & Petrides, 2003). Für die TCC1-Domäne ergibt sich daher bei vollständiger Faltung eine minimale Länge von 3,9 nm und für die TCC2-Region von 5,0 nm. Der äußere Durchmesser der tetrameren, parallelen *coiled-coil* Struktur der TCC2-Domäne von *KCNQ1* beträgt etwa 2,7 nm (Wiener *et al.*, 2008), von *KCNQ4* rund 2,4 nm (Howard *et al.*, 2007). Für *KCNQ2* sind vergleichbare Werte anzunehmen. Der gemessene hydrodynamischen Radius könnte sich als Mittelwert ergeben, da es sich bei der *si*-Domäne von *KCNQ2* nicht um eine globuläre Struktur handelt.

4.1.3 Die isolierte *si*-Domäne von *KCNQ3* als Tetramerisierungsdomäne

Die Assemblierung der isolierten *si*-Domäne von *KCNQ3* unterschied sich von der von *KCNQ2*. Während bei pH 12 die isolierte *si*-Domäne Dimere ausbildete, zeigte diese bei pH 11 eine zeitabhängige Bildung von Tetrameren und Aggregaten. Dieses Verhalten unterstützt den von Tu & Deutsch (1999) für die K_v1 -Familie aufgezeigten Mechanismus, dass sich die Tetramere höchstwahrscheinlich durch die Dimerisierung von Dimeren ausbilden. Dabei unterscheiden sich die Interaktionsflächen der Monomere miteinander von denen der Dimere. Abb. 4.1 gibt dieses schematisch wieder.

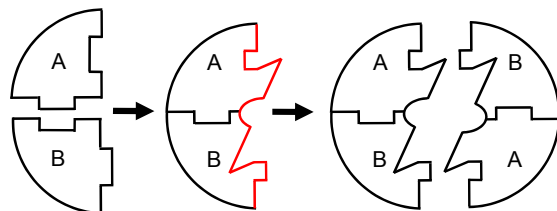


Abb. 4.1: Dimerisierung von Dimeren zu Tetrameren

Die nach der Dimerisierung zweier Monomere veränderte Interaktionsfläche ist rot dargestellt. (Abb. nach Tu & Deutsch, 1999.)

Offensichtlich übt der Puffer einen Einfluss auf die Oligomerisierung der *si*-Domäne von *KCNQ3* aus. Dabei kann die Ursache entweder in der veränderten Ladung der Aminosäureseitenketten oder dem unterschiedlichem Salzgehalt des Puffers bei pH 11 bzw. pH 12 zu finden sein. Beide Faktoren könnten über die Ladungen auf der Oberfläche des *coiled-coil* einen Einfluss auf die Ausbildung eines polaren Netzwerkes haben, wie es von Howard *et al.* (2007) für die tetramere TCC2-Domäne von *KCNQ4*, von Wiener *et al.* (2008) für die tetramere TCC2-Domäne von *KCNQ1* und von Nakajo & Kubo (2008) für *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromeren diskutiert wird.

Da die in dieser Arbeit verwendeten Puffer keineswegs physiologischen Bedingungen gleichen, ist anzunehmen, dass in der Zelle die Assemblierung über weitere Faktoren beeinflusst wird. Dabei konnten Wiener *et al.* (2008) zeigen, dass Calmodulin (CaM) keinen direkten Einfluss auf die Oligomerisierung von *KCNQ1* hat. Bei einem von ihnen untersuchten Peptid

der TCC1-Region von *KCNQ1* konnten diese zeigen, dass jenes Dimere ausbildet, die konzentrationsabhängig zu einem Tetramer dimerisieren. Dieses bietet eine Erklärungsmöglichkeit für die bei der isolierten *si*-Domäne von *KCNQ3* gefundenen, zeitabhängigen Dimerisierung von Dimeren, sofern die Zeitabhängigkeit Ausdruck einer Konzentrationsabhängigkeit der Reaktion ist.

Der Mechanismus der Tetramerisierung durch Dimerisierung von Dimeren wird dadurch unterstützt, dass bei den aufkonzentrierten Tetrameren der unmarkierten, der markierten und der TCC1-mutierten *si*-Domäne von *KCNQ2* in der BN-PAGE ein teilweiser Zerfall der Tetramere in Dimere beobachtet werden konnte, während die dimeren Spezies der TCC2-mutierten *Q2-TCC2_{LzuP}* und *Q2-TCC1+2_{LzuP}* nicht weiter zerfielen. Er macht außerdem die Anordnung gleicher Untereinheiten nebeneinander bei den beiden möglichen 2:2 *KCNQ2/ KCNQ3*-Heteromeren (Abb. 3.32) wahrscheinlicher, denn bei den mittels *Molecular Modelling* erstellten Modellen konnte keine der Möglichkeiten ausgeschlossen werden.

4.1.4 Die *si*-Domäne als *coiled-coil*

Nach der Renaturierung der T1-Domäne aus *Shaker* wurde diese als punktsymmetrisches Tetramer kristallisiert (Kreusch *et al.*, 1998). Dabei bildet ein einzelnes T1-Protein eine sogenannte BTB (*broad complex tram-track bric-a-brac*)- oder auch POZ (*pox virus and zinc finger*)-Faltung aus, welche eine bekannte Protein-Interaktionsdomäne darstellt (Stogios *et al.*, 2005). Diese ist aber grundsätzlich anders als *coiled-coil* Domänen aufgebaut. Die Strukturbestimmung mittels Kristallstrukturanalyse bzw. NMR-Spektroskopie der isolierten *si*-Domäne von *KCNQ2* gelang trotz hochkonzentrierter Proteinlösungen nicht. In der PDB-Datenbank findet sich keine tetramere, tandem *coiled-coil* Struktur mit welcher die *si*-Domäne der KCNQ-Kanäle vergleichbar wäre.

Howard *et al.* (2007) konnten die Struktur eines Bereichs der TCC2-Domäne von *KCNQ4* aufklären. Wiener *et al.* (2008) gelang dies für einen vergleichbaren Abschnitt von *KCNQ1*. In beiden Fällen ergab sich eine parallele, tetramere *coiled-coil* Struktur. Für die vollständigen *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* konnte die Ausbildung einer *coiled-coil* Struktur nur indirekt nachgewiesen werden: Es ergab sich in beiden Fällen eine stufenlose Denaturierung über ein großes Temperaturintervall, welche bereits für andere *coiled-coil* Domänen beschrieben wurde (Jenke *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Wiener *et al.*, 2008). Nach dem Abkühlen bildeten sich in beiden Fällen wieder Tetramere bzw. Dimere aus, deren Renaturierung bei der *si*-Domäne von *KCNQ2* zum Großteil, bei der von *KCNQ3* allerdings nur zum geringen Teil möglich war.

4.1.5 Zur Bedeutung der TCC-Domänen in *KCNQ2* und *KCNQ3*

Die mögliche Bedeutung der TCC-Domänen unterscheidet sich bei den einzelnen Mitgliedern der KCNQ-Familie. Auffällig ist zunächst, dass sich die Vorhersage der *coiled-coil* Wahrscheinlichkeiten für die TCC1-Domänen bei den verschiedenen Mitgliedern der KCNQ-Kanäle erheblich unterscheidet, obwohl die Aminosäuresequenz der Familienmitglieder in diesem Bereich hoch konserviert ist (vgl. Abb. 1.7; Tab. 3.1). Haitin (2008) nimmt an, dass die Konservierung der im Inneren der *coiled-coil* gelegenen Aminosäuren eine generelle Rolle bei der Vermittlung der Oligomerisierung spielt, während die an der Oberfläche befindlichen Aminosäureseitenketten als Plattform für die Assoziation mit Proteinen dient, welche in der Regulation und/oder dem *trafficking* der Kanäle involviert sind.

Im Gegensatz dazu zeigt die Aminosäuresequenz der TCC2-Domäne signifikante Unterschiede bei den Familienmitgliedern (vgl. Abb. 1.7). Deswegen wird angenommen, dass diese eine bestimmende Größe in der untereinheitenspezifischen Assemblierung darstellt und damit deren Homo- und Heteromerisierung wesentlich beeinflusst (Maljevic *et al.* 2003; Schwake *et al.* 2003, 2006). Die in dieser Arbeit dargestellten experimentellen Befunde bestätigen diese Annahme.

Um die Rolle der einzelnen TCC-Domänen bei der Assemblierung von *KCNQ2* und *KCNQ3* aufzuklären, wurden Mutanten untersucht, bei denen Aminosäuren der kritischen a- und d-Positionen des *coiled-coil* Motivs gegen Proline ersetzt wurden. Dieser Austausch stört eine α -helikale Sekundärstruktur, so dass die Voraussetzung zur Ausbildung eines *coiled-coil* verloren geht. Diese Methode hat sich bereits bei der Untersuchung der *coiled-coil* Domänen von *KCNQ1* als geeignet erwiesen (Kanki *et al.*, 2004). Die Untersuchung der isolierten *si*-Domänen gibt dabei die grundsätzlich möglichen Assemblierungen wieder. Der Vergleich mit den von Schwake *et al.* (2003, 2006) durchgeführten elektrophysiologischen Messungen erlaubt Aussagen zur funktionellen Bedeutung innerhalb des vollständigen Kaliumkanals.

Dabei kann die gegenseitige Beeinflussung der TCC-Domänen durch ihre räumliche Nähe innerhalb der *si*-Domäne oder des Kanals nicht ausgeschlossen werden. Die Position der Mutationen innerhalb der *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* ist in Abb. 4.2 wiedergegeben. Die Festlegung der Mutationen erfolgte analog zu den Untersuchungen von Schwake *et al.* (2006). Dabei war das entscheidende Kriterium, die *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit maximal zu senken. Da insbesondere der Bereich der TCC1-Domäne, für den α -Helices vorhergesagt werden, zweigeteilt ist (Abb. 4.2, rote Positionen), kann nicht ausgeschlossen werden, dass in dessen vorderen Teil auch bei Mutation ein geringer Anteil

der potenziell α -helikalen Sekundärstruktur erhalten bleibt. Zwar zeigt die aus den CD-Spektren bestimmte α -Helikalität eine deutliche Abnahme dieser Sekundärstruktur, diese muss aber keiner vollständigen Auflösung der Struktur entsprechen.

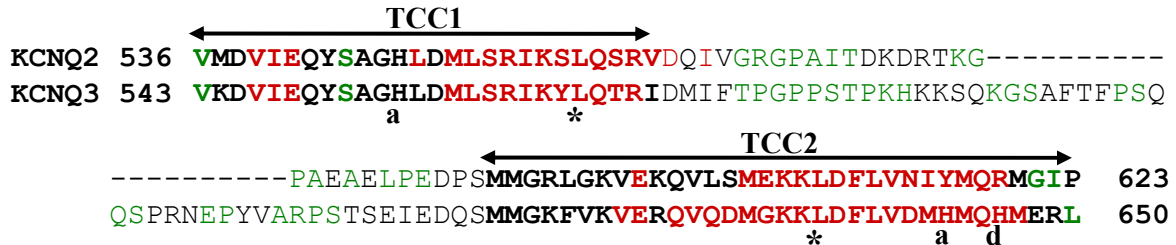


Abb. 4.2: Sekundärstrukturvorhersage der *si*-Domänen und Lage der eingefügten Mutationen
 Dargestellt sind die beiden TCC-Domänen (fett) und der dazwischenliegende Bereich. Für die rot dargestellten Aminosäuren wird eine α -Helix, für die grün dargestellten eine Schleife (*loop*) vorhergesagt. Die Positionen der Leucin/Prolin Veränderungen sind mit einem Stern markiert. Die an a- und d-Positionen befindlichen Histidine sind durch a bzw. d gekennzeichnet.

Bei der Untersuchung der isolierten *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* mit mutierter TCC1-Domäne haben sich keine wesentlichen Unterschiede in der Oligomerisierung gegenüber den jeweiligen Wildtyp-Proteinen gezeigt. Somit scheint für die Assemblierung der reinen *si*-Domäne die TCC1-Domäne eine untergeordnete Rolle zu spielen, sofern die Auflösung der Sekundärstruktur (α -Helix) und Quartärstruktur (*coiled-coil*) in der TCC1-Domäne vollständig erfolgt ist. Die recht unterschiedlichen *coiled-coil* Wahrscheinlichkeiten der TCC1-Domänen der einzelnen *KCNQ*-Mitglieder (Tab. 3.1) könnten diese Vermutung unterstützen.

Bei der elektrophysiologischen Untersuchung entsprechender Mutationen durch Schwake *et al.* (2006) im vollständigen Kanal zeigten sich für *KCNQ2* nur schwache Ströme, während die Entfernung der TCC1-Domäne zum vollständigen Verlust der Ströme führte. Auch die Einführung der entsprechenden TCC1-Mutation in *KCNQ3* führte zum vollständigen Verlust der Ströme. Somit scheint die TCC1-Region bei *KCNQ2* und *KCNQ3* weniger bedeutend für die Assemblierung der *si*-Domäne zu sein, als für die Funktion, das *trafficking* oder das *gating* des vollständigen Kanals.

Die isolierten *si*-Domänen von *KCNQ2* und von *KCNQ3* mit Mutation der TCC2-Domäne bildeten Dimere. Damit erscheint die strukturelle Integrität der TCC2-Domäne für die Tetramerisierung der isolierten *si*-Domänen von entscheidender Bedeutung zu sein. Die Untersuchung der entsprechenden TCC2-Mutation im vollständigen *KCNQ2*-Kanal wies hingegen nur geringfügig kleinere Ströme als den des Wildtyps auf; auch die vollständige Deletion der TCC2-Domäne führte zu vergleichbaren Strömen (Schwake *et al.*, 2006). Die Bildung von Strömen durch diese Konstrukte könnte dabei auch auf die hohen Proteinkonzentrationen zurückzuführen sein.

trationen im heterologen Expressionssystem zurückzuführen sein, so wie es für die T1-Domäne diskutiert wird (Kobertz *et al.*, 1999; Zerangue *et al.*, 2000). Ebenso zeigte die TCC2-Mutation in *KCNQ3* ein mit dem Wildtyp-Kanal vergleichbares Verhalten (Schwake *et al.*, 2006). Somit ergibt sich auch bei der Untersuchung der TCC2-Domäne eine unterschiedliche Bedeutung für die Assemblierung der isolierten *si*-Domäne und die Bedeutung innerhalb des vollständigen, homomeren Kanals. In letzteren kann die Störung der Sekundärstruktur der TCC2-Domäne offenbar kompensiert werden. Diese könnte somit vielmehr bei der Heteromerisierung von *KCNQ2* und *KCNQ3* eine Rolle spielen.

4.1.6 Weitere Einflüsse auf die *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3*

Im Vergleich zu den N-terminal markierten *si*-Domänen von *KCNQ2* bildeten die C-terminal markierten Konstrukte grundsätzlich vergleichbare Oligomere aus (Tab. 3.3 und 3.5). Dabei waren insbesondere die aufkonzentrierten Tetramere des Wildtyps und der TCC1-Mutante deutlich instabiler (Abb. 3.10 B und C). Eine in sich stimmige, aber dennoch hypothetische Erklärung bietet die Annahme, dass die drei unmittelbar auf die TCC2-Domäne folgenden Aminosäuren ProlinProlinThreonin (PPT, vgl. Anhang I) der *KCNQ2* Proteinsequenz einen Einfluss auf die Assemblierung der TCC2-Domäne ausüben.

Ursprünglich sollten diese Aminosäuren als Verbindungsglied zur C-terminalen His₆-Sequenz dienen. Es ist aber anzunehmen, dass die Anwesenheit von Prolinen nicht nur an hydrophoben Positionen des *coiled-coil* Motivs, sondern auch am Ende einer α -Helix dessen Struktur destabilisiert. Die Mutanten, bei denen die α -Helix der TCC2-Domäne verändert war, bildeten stabile Dimere (Abb. 3.10 D und E). Es ist anzunehmen, dass die TCC2-Mutation die starre Konformation des Verbindungsgliedes egalisiert und sterisch günstigere Anordnungen ermöglicht, was in stabileren Oligomeren resultiert.

Da die PPT-Sequenz auch im vollständigen *KCNQ2*-Kanal vorkommt, ist anzunehmen, dass die beiden Prolinseitenketten dort ebenso einen sterischen Einfluss auf die TCC2-Domäne und dessen Assemblierungseigenschaften ausüben. Andere KCNQ-Mitglieder besitzen keine derartige Prolin-Sequenz. Interessant ist aber, dass sich bei *KCNQ5* eine putative cAMP-abhängige Phosphorylierungsstelle an der Position S600 (Schroeder *et al.*, 2000 b) befindet; dies ist ebenfalls die erste Aminosäure nach der TCC2-Domäne. Beimgraben (2007) hat Hinweise darauf gefunden, dass die Einführung einer negativen Ladung an dieser Position „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*“ führt.

Die TCC2-Regionen von *KCNQ2*, *KCNQ4* und *KCNQ5* weisen keine derartigen His-Positionen auf. Allerdings besitzen alle KCNQ-Mitglieder an der gleichen α -Position der TCC1-Domäne einen Histidinrest (Abb. 4.3). Dieses liegt in dem Bereich ohne α -helikale Sekundärstrukturvorhersage. Es ist also auch nicht auszuschließen, dass die bereits angesprochene Zweiteilung der α -Helix in der TCC1-Domäne aller KCNQ-Kanäle die Bindung eines Metallions an dieser Position ermöglicht. Grundsätzlich ist für die Wildtyp-Domäne auch denkbar, dass die Ausbildung einer *coiled-coil* Struktur dazu führt, dass sich in der TCC1-Domäne keine zweigeteilte, sondern eine durchgängige α -Helix ausbildet, welche durch die hydrophoben Interaktionen im Inneren des *coiled-coil* stabilisiert sein könnte. Die genaue Funktion einer Ionenbindung durch die Histidinseitenketten wäre dabei noch zu untersuchen.

4.2 Die TCC-Domänen aller KCNQ-Mitglieder im Vergleich

4.2.1 Vergleich der TCC2-Domänen aller KCNQ-Mitglieder

Howard *et al.* (2007) haben die TCC2-Domänen aller KCNQ-Kanäle in Form markierter Fusionsproteine in Maltose-Puffer pH 7,3 untersucht. Dabei haben sie für *KCNQ1*, *KCNQ2*, *KCNQ4* und *KCNQ5* die Bildung von Tetrameren in der SEC gezeigt. Für die TCC2-Domäne von *KCNQ3* ergab sich ein scharfer *Peak*, welcher von Howard *et al.* (2007) als Dimere und Monomere beschrieben wird, wobei die Berechnung der Anzahl an Untereinheiten eher ein Dimer nahelegt. Diese Daten werden von der SEC eines TCC2-Peptids von *KCNQ3* bei pH11 in der vorliegenden Arbeit unterstützt, welche ebenfalls Dimere ergab. Für pH 12 liegen keine Ergebnisse einer SEC vor, die CD-Spektroskopie ergab aber deutlich weniger α -helikale Anteile, so dass die Bildung von denaturierten Monomeren nicht auszuschließen ist.

Howard *et al.* (2007) haben die Sekundärstruktur der TCC2-Domäne von *KCNQ4* ohne Markierung bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Dabei ergab sich bei pH 3, pH 7,5 und pH 9 ein vergleichbares, stark α -helikales CD-Spektrum. Daraus kann, auch aufgrund der bei der unmarkierten *si*-Domäne von *KCNQ2* aufgetretenen Abhängigkeit zwischen Oligomerisierungszustand und Amplitude des CD-Spektrums, gefolgert werden, dass die Tetramere der TCC2-Domäne von *KCNQ4* innerhalb des untersuchten pH-Bereiches stabil sind.

Für ein TCC2-Peptid von *KCNQ2* liegen bisher unveröffentlichte Daten (der Arbeitsgruppe Dr. M. Schwake) vor, die wie bei *KCNQ3* bei pH 11 die Bildung eines Dimers zeigen. Dies steht im Widerspruch zu den von Howard *et al.* (2007) bei pH 7,3 nachgewiesenen TCC2-Tetrameren von *KCNQ2* und kann entweder durch den unterschiedlichen Puffer oder die Markierung erklärt werden. Im Gegensatz dazu haben Wiener *et al.* (2008) die TCC2-Domäne

von *KCNQ1* analysiert und ein Tetramer nachweisen können, wobei deren Bedingungen denen von Howard *et al.* (2007) deutlich ähnlicher waren.

Insgesamt unterstützt der unterschiedliche Oligomerisierungszustand der TCC2-Domänen der verschiedenen KCNQ-Mitglieder die Annahme, dass insbesondere dieser Bereich einen Einfluss auf die untereinheitenspezifische Assemblierung ausübt.

In diesem Zusammenhang ist die elektrophysiologische Untersuchung eines *KCNQ4*-Kanal ohne TCC2-Domäne (*Q4 del TCC2*) zu erwähnen. Während die Deletion des entsprechenden Bereichs bei *KCNQ2*, wie auch die Leucin/Prolin Mutation in der TCC2-Domäne von *KCNQ3*, zu mit dem Wildtyp vergleichbaren Strömen geführt hat (Schwake *et al.*, 2006), kam es bei *Q4 del TCC2* zum völligen Stromverlust. Bei *Xenopus* Oozyten bildete sich dabei kein für die Expression von Kaliumkanälen typisches Ruhepotential aus, obwohl das Protein sich im Gesamtlysat der Oozyten nachweisen ließ.

Kanki *et al.* (2004) haben verschiedene Deletionsmutanten der CTR von *KCNQ1* untersucht. Dabei zeigte nur die Deletion des Bereichs unmittelbar nach der TCC2-Domäne bis zum C-Terminus eine effektive Oberflächenexpression und messbare Ströme. Die Entfernung der davor liegenden Aminosäuren 610 bis 621, welche den hinteren Teil der TCC2-Domäne bilden, verhinderte die Oberflächenexpression nahezu vollständig. Wiener *et al.* (2008) konnten zeigen, dass die isolierte CTR von *KCNQ1* mit Deletion des TCC1-Bereichs ebenso wie die vollständige CTR mit CaM einen 4:4-Komplex ausbildet. Somit ist anzunehmen, dass die TCC2-Domäne von *KCNQ1* auch im funktionellen Kanal die Tetramerisierung unabhängig von der TCC1-Domäne induzieren kann.

Dies deutet darauf hin, dass auch bei *KCNQ1*, wie bei *KCNQ4*, die TCC2-Domäne zur Homotetramerisierung der Kanäle und zur Oberflächenexpression notwendig ist, die TCC2-Domäne somit die Tetramerisierungsdomäne dieser Kanäle darstellt. Im Gegensatz dazu ist die TCC2-Domäne bei *KCNQ2* und *KCNQ3* zur Homotetramerisierung nicht notwendig, ihre Bedeutung könnte also in der Heteromerisierung liegen. Für die TCC2-Domäne von *KCNQ3* konnten Schwake *et al.* (2006) zeigen, dass diese den effizienten Transport heteromerer *KCNQ2/KCNQ3*-Kanäle an die Plasmamembran vermittelt. Im Übrigen spiegelt sich dieser Bedeutungsunterschied für die KCNQ-Kanäle im Oligomerisierungszustand der TCC2-Domänen wieder: Bisher konnten nur für *KCNQ2* und *KCNQ3* Dimere nachgewiesen werden.

4.2.2 Vergleich der TCC1-Domänen aller KCNQ-Mitglieder

Da die TCC2-Domäne für die Homomerisierung von *KCNQ2* und *KCNQ3* offenbar nicht entscheidend ist, soll im Folgenden die Bedeutung der TCC1-Domäne für die KCNQ-Mitglieder herausgearbeitet werden. Die Störung der Sekundärstruktur der TCC1-Domäne in *KCNQ2* führt zu geringen Strömen, die bei Deletion der Domäne vollständig verschwinden (Schwake *et al.*, 2006); bei *KCNQ3* reicht dazu bereits die Störung der TCC1-Domäne aus. Dies deutet darauf hin, dass insbesondere die Auflösung der *coiled-coil* Struktur den Verlust der Ströme bewirkt, wobei keine Aussagen dazu gemacht werden können, ob die Veränderungen die Assemblierung, die Oberflächenexpression oder das *gating* der Kanäle stören.

Bei der Homomerisierung der isolierten *si*-Domäne von *KCNQ3* ist bemerkenswert, dass der Leucin/Prolin Austausch in der TCC1-Domäne die bereits im Wildtyp äußerst geringe *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit (2,4%) völlig aufhebt. Trotzdem sind Wildtyp und TCC1-Mutante, genau wie das TCC1-Peptid von *KCNQ3*, in der Lage, dimere und tetramere *coiled-coil* Strukturen auszubilden. Eine geringe *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit schließt die Möglichkeit zur Ausbildung einer α -Helix nicht aus, es kann aber auch eine Oligomerisierung unabhängig von dieser Sekundärstruktur in Betracht kommen.

Aufgrund des klar definierten Motivs lassen sich *coiled-coil* Strukturen gut vorhersagen. Grundsätzlich erfolgt deren Vorhersage anhand des Sequenzvergleichs mit Proteinen, für welche bereits derartige Domänen nachgewiesen worden sind. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse auch von dem jeweils verwendeten Programm abhängen können. Die Messung einer Schmelzkurve des TCC1-Peptids von *KCNQ3* könnte die Ausbildung einer *coiled-coil* Domäne abschließend be- oder widerlegen.

Grundsätzlich interessant ist zunächst der pH-abhängige Wechsel bei der Oligomerisierung der TCC1-Domäne von *KCNQ3*: Während bei pH 12 sowohl das TCC1-Peptid als auch die isolierte *si*-Domäne Dimere ausbildeten, unterlief das TCC1-Peptid einen pH-abhängigen Übergang zu Dimeren und Tetrameren bei pH 11, während die vollständige *si*-Domäne von *KCNQ3* eine zeitabhängige Bildung von Tetrameren und Aggregaten zeigte. Dies bedeutet, dass die TCC1-Domäne unter bestimmten Bedingungen in der Lage ist, Tetramere auszubilden und damit den Oligomerisierungszustand der isolierten *si*-Domäne zu bestimmen.

Wiener *et al.* (2008) haben ein Peptid des vorderen TCC1-Bereichs (Aminosäuren 548-565) von *KCNQ1* untersucht und konnten zeigen, dass dieses ein Dimer ausbildet, welches konzentrationsabhängig zu einem Tetramer dimerisiert. Dieses Verhalten ähnelt der pH-abhängigen Bildung von Tetrameren aus Dimeren bei der TCC1-Domäne von *KCNQ3*. Ferner bildet die

CTR von *KCNQ1* mit Deletion der TCC2-Domäne mit CaM nur noch einen 2:2 Komplex aus, während die vollständige CTR einen 4:4-Komplex bildet (Wiener *et al.*, 2008). Somit ist vorstellbar, dass die TCC1-Region von *KCNQ1* bei der Homomerisierung zunächst eine Dimerisierung der vollständigen Untereinheit induziert, welche dann durch hohe lokale Konzentrationen Tetramere ausbilden kann (Wiener *et al.*, 2008). Umgekehrt wird eine *KCNQ1*-Mutante ohne die Aminosäuren 548-653, also den Großteil der TCC1-Domäne, nicht an die Oberfläche von CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen transportiert und bildet dementsprechend auch keinen Strom aus (Wiener *et al.*, 2008).

Die Grundlagen bei der Homomerisierung der TCC1-Domäne von *KCNQ1* und *KCNQ3* sind sich also offenbar ähnlich. Dabei scheint bei *KCNQ1*, wie bereits diskutiert, auch die TCC2-Domäne für die Homotetramerisierung und die Oberflächenexpression notwendig. Für *KCNQ3* hingegen ist die TCC2-Domäne zur Homomerisierung nicht notwendig. Dabei wiesen diese beiden KCNQ-Mitglieder eine Besonderheit auf: Während *KCNQ1* nur Homomere bildet, bildet *KCNQ3* bevorzugt Heteromere (Schwake *et al.*, 2003; Howard *et al.*, 2007). *KCNQ3* kann *in vitro* auch homomere Kanäle ausbilden (Schwake *et al.*, 2000), deren physiologische Relevanz noch nicht *in vivo* geklärt ist. Howard *et al.* (2007) vermuten anhand des Sequenzvergleichs mit dem von *KCNQ4* kristallisierten TCC2-Bereich, dass die relevanten Unterschiede für die ungleichen Homo- und Heteromerisierungseigenschaften in der TCC2-Domäne lokalisiert sind.

4.3 Zur Assemblierung homomerer *KCNQ3*

Howard *et al.* (2007) haben für *KCNQ3* zwei wichtige Bereiche bei der Homomerisierung der TCC2-Domäne beschrieben. Ersterer ist eine α -Position, welche einen Phenylalaninrest trägt. Diese Position hat sich auch bei den in dieser Arbeit erstellten Modellen als kritisch herausgestellt, da deren Seitenkette den Radius des *coiled-coils* verbreitert und ungünstige sterische Wechselwirkungen ausübt.

Der zweite Bereich besteht aus deutlichen Abweichungen des polaren Netzwerkes der TCC2-Domäne von *KCNQ3* gegenüber *KCNQ2*, *KCNQ4* und *KCNQ5*. Bei den drei letzteren Kanälen könnte diese auf der Oberfläche der *coiled-coil* gelegene Struktur, zumindest anhand der Aminosäuresequenz, gleich sein (Howard *et al.*, 2007). Im Folgenden soll der Frage nachgegangen werden, ob diese Differenzen für die unterschiedliche Assemblierung der isolierten *si*-Domäne von *KCNQ3* bei pH 11 und pH 12 ursächlich sein können.

Die sehr gute Löslichkeit der isolierten *si*-Domänen im Basischen könnte auf den großen Anteil an stark basischen Seitenketten zurückgeführt werden. Bei der *si*-Domäne von *KCNQ2*

sind 14,6 % Arginine und Lysine, bei *KCNQ3* sind es 14,7 %. Unter den verwendeten Bedingungen ist die Deprotonierung des Großteils dieser Seitenketten auf der Oberfläche der *coiled-coil* Struktur anzunehmen.

Howard *et al.* (2007) haben das polare Netzwerk für die TCC2-Domäne von *KCNQ4* aufgezeigt und dann dessen Positionen auf die Aminosäuresequenz von *KCNQ3* übertragen. Dabei unterscheidet sich die Anzahl der daran beteiligten Arginine und Lysine nicht, so dass ein polares Netzwerk auf den ersten Blick nicht als Ursache für die pH-abhängige Assemblierung in Betracht kommt. Allerdings muss bedacht werden, dass bei *KCNQ3* völlig andere Positionen als bei *KCNQ4* an der Ausbildung eines Netzwerkes beteiligt sein könnten. Erst die Strukturklärung der TCC2-Domäne von *KCNQ3* wird somit die oben gestellte Frage beantworten können.

4.4 Bildung von *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromeren

4.4.1 Bildung heteromerer *KCNQ2/KCNQ3* *si*-Domänen

Die Heteromerisierung von *KCNQ2* und *KCNQ3* ist im Zusammenhang mit dem bereits beschriebenen M-Strom von besonderer physiologischer Bedeutung (Wang *et al.*, 1998 a; Schroeder *et al.*, 1998). Die Expression dieser beiden Kaliumkanaluntereinheiten überschneidet sich dabei in verschiedenen Neuronen (Cooper *et al.*, 2000), allerdings ist nicht immer eine Koexpression zu finden (Devaux *et al.*, 2004). Schwake *et al.* (2003) konnten zeigen, dass die *si*-Domänen von *KCNQ2* bzw. *KCNQ3* unmittelbar an der Heteromerisierung beteiligt sind. Dieses konnte in der vorliegenden Arbeit auch auf Ebene der isolierten *si*-Domänen nachgewiesen werden.

Dabei ergab die Untersuchung eines äquimolaren Gemischs von Tetrameren der *KCNQ2* *si*-Domäne mit den Dimeren der *KCNQ3* *si*-Domäne mehrere Hinweise auf die Ausbildung heteromerer Tetramere, deren Signal sich in der SEC mit dem der Tetramere der *KCNQ2* *si*-Domäne überlagern. So ließe sich zum Beispiel der höhere Anteil an α -Helices bei der Proteinmischung in pH 12 durch die Stabilisierung der schwächer α -helikalen *si*-Domäne von *KCNQ3* durch die Ausbildung von *coiled-coil* Heteromeren erklären. Dabei konnte zu deren *KCNQ2/KCNQ3*-Verhältnis keine Aussage gemacht werden. Die heteromere Spezies selbst konnte auch nicht isoliert werden, wobei die ebenfalls aufgezeigte unterschiedliche Salz- und pH-Empfindlichkeit der *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* einen Ansatzpunkt bietet, um die möglichen heteromeren Tetrameren mittels Ionenaustausch-Chromatographie von den homomeren zu trennen.

4.4.2 Interaktion der CTR von *KCNQ2* und *KCNQ3*

Um die mögliche Interaktion der *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* innerhalb der CTR nachzuweisen, sollten verschiedene *KCNQ2*- und *KCNQ3*-Konstrukte (Kap. 2.1.10.2) im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid*-System (Kap. 2.2.4) untersucht werden. Dabei kam es zu verschiedenen Ergebnissen, welche den Nachweis einer möglichen Interaktion verhinderten: Selbstaktivierung, Interaktion mit der Negativkontrolle, ausbleibende Interaktion mit der Positivkontrolle sowie mangelnde Expression oder Hydrolyse des überexprimierten Proteins (nicht gezeigt). Die systematische Untersuchung der Interaktion der C-Termini von *KCNQ2* und *KCNQ3* im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid* System war somit nicht möglich.

Ein möglicher Grund für die Selbstaktivierung oder die Hydrolyse könnte ein von Ekberg *et al.* (2007) beschriebener Mechanismus zur Regulation der Oberflächenexpression der *KCNQ2*- und *KCNQ3*-Kanäle sein. Beide Untereinheiten können mit der *Nedd4-2* Ubiquitin Ligase interagieren, was zu deren Ubiquitinylierung führt. Anschließend werden die Untereinheiten höchstwahrscheinlich aus der Membran entfernt (Harvey & Kumar, 1999; Abriel & Staub, 2005). Auch für die Hefe ist eine *Nedd4* Ubiquitin Ligase beschrieben worden (Belgareh-Touze *et al.*, 2008). Somit ist nicht auszuschließen, dass im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid*-System die überexprimierten CTR von *KCNQ2* und *KCNQ3* ubiquitinyliert und abgebaut wurden.

4.4.3 Bildung heteromerer *KCNQ2/KCNQ3*-Kanäle

Die Interaktion der *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* konnte im Zusammenhang mit der Untersuchung der Schleife zwischen den TCC-Domänen nachgewiesen werden. Hierfür wurden Konstrukte hergestellt, in welchen diese unter Berücksichtigung des *coiled-coil* Motivs deletiert war (*Q2 del Loop* und *Q3 del Loop*). Verschiedene Koexpressionen der *loop*-deletierten und Wildtyp-Konstrukte wiesen alle die für *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromeren typische Stromverstärkung auf. Diese beruht vermutlich auf einer erhöhten Oberflächenexpression. Dazu ist bisher bekannt, dass zum einen die TCC2-Domäne von *KCNQ3* den effizienten Transport der Heteromeren an die Plasmamembran vermittelt (Schwake *et al.*, 2006), zum anderen erfolgt eine Regulation durch den von Ekberg *et al.* (2007) beschriebenen Mechanismus.

Die Koexpression von *Q2 del Loop/Q3 del Loop* ergab einen gegenüber den Wildtyp- Heteromeren schwach verringerten Strom (86 %), während die Koexpression von *KCNQ2/Q3 del Loop* einen stark vergrößerten Strom aufwies (149 %). Im Gegensatz dazu führte die Abwesenheit der *KCNQ2*-Schleife bei der gemeinsamen Untersuchung von

Q2 del Loop/KCNQ3 zu einem stärker verringerten Strom (65 %). Diese Ergebnisse belegen die Ausrichtung der *si*-Domäne als eine doppelte, tetramere *coiled-coil* Struktur. Gleichzeitig scheint die Anwesenheit der *KCNQ3*-Schleife die Oberflächenexpression der Heteromeren zu hemmen, während die *KCNQ2*-Schleife eine begünstigende Wirkung darauf ausübt. Bei der Koexpression von *Q2 del Loop/Q3 del Loop* könnten sich durch die Entfernung beider Schleifen diese Effekte gegenseitig nahezu aufheben.

Eine Erklärung für den scheinbar unterschiedlichen Einfluss der beiden Schleifen, vermutlich auf die Oberflächenexpression, könnte in der unterschiedlichen Flexibilität zwischen den fusionierten TCC-Domänen bestehen. In *Q2 del Loop* sinkt die *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit zwischen den beiden Bereichen ab (Abb. 3.36 B), was in einer Rest-Flexibilität zwischen den beiden Bereichen resultieren könnte. Da die *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit der TCC1-Domäne von *KCNQ3* trotz Bildung von spezifischen Oligomeren äußerst gering ist, kann keine Aussage zur Flexibilität zwischen den TCC-Domänen in *Q3 del Loop* gemacht werden.

Neben einer Bedeutung als flexible Verbindung könnte die Schleife zwischen den TCC-Domänen der Regulation der Oberflächenexpression dienen. Bisher sind keine Interaktionspartner für diesen Bereich nachgewiesen worden. Allerdings konnten Ekberg *et al.* (2007) die Interaktion von *KCNQ2* und *KCNQ3* mit der *Nedd4-2* Ubiquitin Ligase zeigen, welche die Oberflächenexpression beeinflusst. Grundsätzlich kann die *Nedd4-2* Ubiquitin Ligase an ein PY-Motiv binden (Konsensussequenz PPxY, mit x als beliebiger Aminosäure), welches sich typischerweise in den CTR der Zielproteine findet (Kumar *et al.*, 1992; Sudol *et al.*, 1996, Staub *et al.*, 1997).

KCNQ3 weist allerdings nur ein atypisches PY-Motiv auf (PPxPPY), welches nicht für die Interaktion mit der *Nedd4-2* Ubiquitin Ligase verwendet wird (Ekberg *et al.*, 2007). Dies legt die Existenz einer bisher nicht identifizierten Bindesequenz in der CTR von *KCNQ3* nahe. Die *Nedd4-2* Ubiquitin Ligase kann auch an die Sequenz LPxY (Fotia *et al.*, 2004; Kanelis *et al.*, 2006) binden. Daher stellt sich die Frage, ob in der Schleife zwischen der TCC1- und der TCC2-Domäne von *KCNQ2* und *KCNQ3* ein derartiges Motiv enthalten sein könnte. Abb. 4.4 zeigt die in den *si*-Domänen von *KCNQ1*, *KCNQ2* und *KCNQ3* enthalten Proline und Tyrosine im Vergleich.

Nur die Schleife von *KCNQ3* enthält einen Tyrosinrest, welcher unmittelbar auf eine Prolinseitenkette folgt. Diese Abfolge ist nicht Teil der oben beschriebenen Konsensussequenzen, welche eine beliebige Aminosäure zwischen Prolin- und Tyrosinrest voraussetzen. Außerdem ist die Schleife von *KCNQ3* am längsten und hat mit 17,0 % den höchsten Anteil an Prolinen.

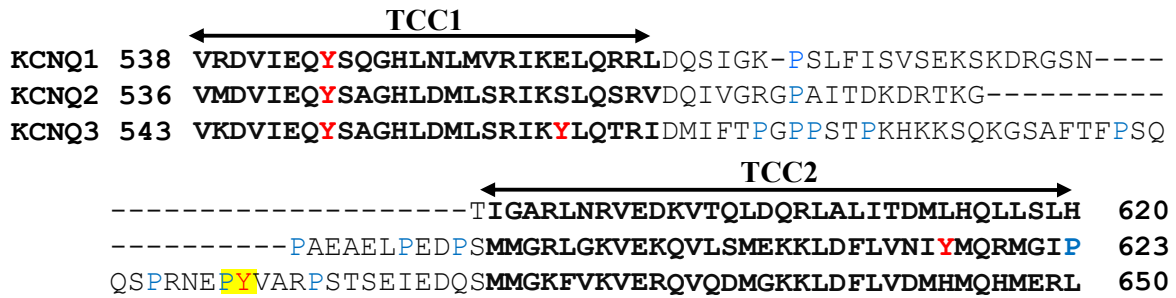


Abb. 4.4: Vorkommen von Prolin und Tyrosin in der si-Domäne von *KCNQ1*, *KCNQ2* und *KCNQ3*
 Dargestellt sind die beiden TCC-Domänen (fett) und der dazwischenliegende Bereich. Positionen von Prolinen sind blau, von Tyrosinen rot hervorgehoben. Die Aminosäurefolge PY in der Schleife von *KCNQ3* ist gelb hinterlegt.

Ekberg *et al.* (2007) führen dazu aus, dass die *Nedd4-2* Ubiquitin Ligase auch Proteine regulieren kann, welche kein PY-Motiv besitzen, unter anderem den Glutamatransporter *EAAT2* (Boehmer *et al.*, 2006), den spannungsabhängigen Kaliumkanal $K_v1.3$ (Henke *et al.*, 2004) und einen Dopamin-Transporter (Sorkina *et al.*, 2006). Damit kann eine Regulation der Oberflächenexpression über die Schleife in der *si*-Domäne von *KCNQ3* nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Ebenso legt die Überführung der beiden bereits beschriebenen Bereiche der TCC2-Domäne von *KCNQ3* (Phenylalaninrest und polares Netzwerk) durch Mutationen in die Aminosäuren von *KCNQ4* die Existenz eines weiteren Faktors nahe, der die Oberflächenexpression des homomeren *KCNQ3*-Kanals beeinflusst. Im Gegensatz zu den Dimeren der Wildtyp TCC2-Domäne, bilden die Mutanten in der SEC Tetramere aus (Howard *et al.*, 2007). Allerdings verursachen diese im vollständigen Kanal keinen (eventuell aufgrund erhöhter Oberflächenexpression) verstärkten Strom, unabhängig von den Assemblierungsmöglichkeiten der TCC2-Domäne (Howard *et al.*, 2007).

Die Regulation der Oberflächenexpression von *KCNQ3*-Kanälen über eine *Nedd4-2* Ubiquitin Ligase-Bindestelle in der Schleife zwischen der TCC1- und der TCC2-Domäne sollte, ebenso wie der Einfluss der Flexibilität zwischen den TCC-Domänen, in zukünftigen Experimenten geklärt werden.

4.4.4 Modell zur Heteromerisierung von *KCNQ2* und *KCNQ3*

Die Auswertung aller in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse und die Einordnung in die Literatur ermöglichen die Entwicklung eines möglichen Modells zur Heteromerisierung von *KCNQ2* und *KCNQ3*: Wiener *et al.* (2008) konnten für *KCNQ1*, sowie Howard *et al.* (2007) für *KCNQ4* die Bildung homomerer Tetramere der TCC2-Domäne nachweisen. Peptide der TCC2-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* bilden in der SEC bei pH 11 Dimere aus. In einem heteromeren *KCNQ2/KCNQ3*-Kanal könnte eine Dimerisierung der dimeren TCC2-Regionen

von *KCNQ2* und *KCNQ3* erfolgen. Aufgrund ihrer Lage in der CTR könnte dieser heteromeren, tetrameren *coiled-coil* Domäne eine überprüfende Funktion bei der Assemblierung zu einem funktionellen, heteromeren Kanal zukommen.

Dabei könnte die Ausbildung eines polaren Netzwerkes auf der Oberfläche der heteromeren TCC2-Region, wie von Nakajo & Kubo (2008) diskutiert, zur Stabilität beitragen. Damit wäre auch anzunehmen, dass von beiden möglichen 2:2 Anordnungen im Tetramer wahrscheinlich diejenige die Situation in der Zelle widerspiegelt, in der die gleichen Untereinheiten nebeneinander (und nicht gegenüber) liegen. Gleichzeitig steht dieses Modell im Einklang mit einer Assemblierung durch die Dimerisierung von Dimeren.

4.5 Die Schleife als flexible Verbindung der TCC-Domänen

Die isolierten *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* mit Mutation beider TCC-Domänen bilden Dimere aus. Eine Erklärung dafür wäre, dass die Zerstörung der α -Helix in der TCC1-Domäne nicht vollständig erfolgt ist oder eine Dimerisierung unabhängig von dessen Sekundärstruktur stattfindet. Um eine Bedeutung der verbindenden Schleife zwischen den TCC-Domänen bei der Assemblierung auszuschließen, wurde dieser Bereich in *KCNQ1*, *KCNQ2* und *KCNQ3* deletiert; es entstanden die Konstrukte *Q1 del Loop*, *Q2 del Loop* und *Q3 del Loop*. Da *KCNQ1* nur Homomere bildet, könnte sich die Bedeutung der Schleife in diesem Kanal von der bei *KCNQ2* und *KCNQ3* unterscheiden.

Die Expression von *Q1 del Loop* und *Q3 del Loop* in Oozyten ergab keine nennenswerten Ströme, während dieser bei *Q2 del Loop* größtenteils erhalten blieb. Die Fusionierung der TCC-Domänen führte bei *Q1 del Loop* zu einer durchgängig hohen *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit, die im Gegensatz zu *Q2 del Loop* und *Q3 del Loop* keine Rest-Flexibilität zwischen den fusionierten TCC-Domänen wahrscheinlich macht. Da die Oozyten ein für Kaliumkanäle typisches Ruhepotential aufwiesen, scheint die Deletion der Schleifen in *KCNQ1*, *KCNQ2* und *KCNQ3* keinen Einfluss auf die Homomerisierung der verkürzten Kanäle auszuüben.

Die fehlende strukturelle Flexibilität oder die enge Verbindung der TCC-Domänen scheint sich allerdings auf die Funktionalität von *KCNQ1* auszuwirken. Für diesen Kanal ist die Interaktion eines Leucin-Zippers im vorderen Bereich der TCC2-Domäne mit dem Zielsteuerungsprotein *Yotiao* beschrieben worden (Marx *et al.*, 2002; Kanki *et al.*, 2004; Howard *et al.*, 2007). Kanki *et al.* (2004) konnten zeigen, dass der Transport von *KCNQ1* zur Oberfläche von der strukturellen Integrität der TCC2-Domäne abhängt. Allerdings sind Mutanten, die nach Marx *et al.* (2002) keine Interaktion mit *Yotiao* aufweisen, in ihrer Oberflächenexpression nicht gestört (Kanki *et al.*, 2004). Somit ist anzunehmen, dass sich die Deletion der

Schleife zwischen den TCC-Domänen von *KCNQ1* nicht über eine fehlende Interaktion mit *Yotiao* auswirkt.

Die Deletion einer potenziellen *Nedd4-2* Ubiquitin Ligase-Bindestelle in der Schleife zwischen der TCC1- und TCC2-Domäne von *KCNQ3* sollte sich nur auf die Oberflächenexpression, nicht aber auf die Funktionalität des Kanals auswirken. Die Bedeutung der Schleife in *KCNQ1* und *KCNQ3* zur Bildung eines Stromes könnte also auf eine allgemeinere Ursache zurückzuführen sein.

Bei der Koexpression von *KCNQ1/Q1 del Loop* bzw. *KCNQ3/Q3 del Loop* ergaben sich Ströme, welche in ihrer Amplitude zwischen denen der jeweils homomeren Kanäle lagen. Da keine Messungen mit dominant-negativen Mutanten vorliegen, ist vorerst anzunehmen, dass diese Ströme von homo- und heteromeren Kanälen in statistischer Verteilung verursacht werden. Im Gegensatz dazu entsteht bei der Koexpression von *KCNQ2/Q2 del Loop* ein höherer Strom als beim Wildtyp. Der Verlust der Schleife zwischen den TCC-Domänen von *KCNQ2* scheint bei der Homomerisierung von *KCNQ2*-Kanälen, im Unterschied zur Heteromerisierung mit *KCNQ3*, eine begünstigende Wirkung auf die resultierenden Ströme auszuüben.

Da die TCC-Regionen der KCNQ-Kanäle miteinander über eine flexible Schleife verbunden sind, könnten diese theoretisch eine Interaktion der TCC1- mit der TCC2-Domäne ermöglichen (Abb. 4.5 A).

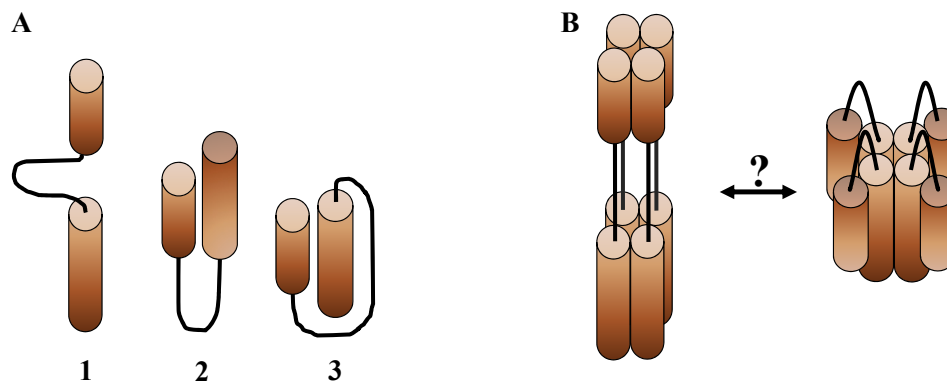


Abb. 4.5: Räumliche Anordnung einer möglichen TCC1/TCC2-Interaktion

(A) Mögliche Interaktionen der TCC1- und TCC2-Domänen innerhalb einer Untereinheit. 1: tandemartige Anordnung mit paralleler Ausrichtung, 2: antiparallele Anordnung, 3: parallele Interaktion. (B) Zwei denkbare Grenzformeln bei der Interaktion der TCC-Domänen innerhalb einer tetrameren *si*-Domäne. Die TCC1-Domäne ist kürzer als die TCC2-Domäne. Die jeweiligen Domänen werden gegen den C-Terminus dunkler.

Dabei könnten sich die TCC-Domänen einer Untereinheit in verschiedenen Orientierungen zueinander anordnen. Sofern eine derartige Interaktion im Rahmen eines tetrameren Kanals erfolgt, könnten sich dabei entweder die Konformationen der *si*-Domänen einzelner Untereinheiten unterscheiden oder die *coiled-coil* Struktur müsste weitere Interaktionsstellen

als die hydrophobe Region im Inneren besitzen, vermutlich auf deren Oberfläche (Abb. 4.5 B). Ansonsten würde die Interaktion der TCC1- und der TCC2-Domäne die hydrophoben Regionen der α -Helices besetzen, so dass diese nicht mehr für eine Oligomerisierung der KCNQ-Kanäle zur Verfügung ständen.

Die Koexpression von *KCNQ2*-Teilproteinen, welche zusammen einen vollständigen, lediglich in der Schleife getrennten Kanal ergaben, konnte keine Interaktion zwischen der TCC1- und der TCC2-Region von *KCNQ2* nachweisen. Dafür müsste eine eventuelle Wechselwirkung aber stabil genug sein, um einen gemeinsamen Transport des unterbrochenen Kanals an die Oberfläche zu ermöglichen.

Interessant ist, dass Schwake *et al.* (2006) eine *KCNQ2*-Untereinheit untersucht haben, in welcher die TCC2-Domäne an den N-Terminus versetzt und die restliche CTR deletiert wurde. Diese wies bei der Koexpression mit *KCNQ3* ebenfalls eine für *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromere typische Stromverstärkung auf, allerdings nicht in der gleichen Stärke. Somit kann die Unterbrechung der Schleife zwischen der TCC1- und TCC2-Domäne nicht die Ursache für das Ausbleiben von Strömen bei den *KCNQ2*-Teilproteinen sein.

Die vorliegenden Experimente haben allerdings gezeigt, dass sich die Bedeutung dieser *KCNQ2*-Schleife bei der Homo- und Heteromerisierung unterscheidet. Sie könnte auch als eine flexible Verbindung der TCC-Domänen die Interaktion einzelner TCC-Domänen mit weiteren Proteinen, so z.B. den KCNE-Untereinheiten, ermöglichen.

4.6 Interaktion zwischen KCNQ- und KCNE-Untereinheiten

KCNQ-Untereinheiten können offenbar über *coiled-coil* Domänen miteinander interagieren. KCNEs als β -Untereinheiten können ebenfalls mit KCNQ-Kanälen interagieren und so die erzeugten Ströme in vielfältiger Form modifizieren (Sanguinetti *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1998; Schroeder *et al.*, 2000 a; Tinel *et al.*, 2000 a und b; Angelo *et al.*, 2002; Grunnet *et al.*, 2002; Strutz-Seebohm *et al.*, 2006). Es stellt sich die Frage, ob sich auch KCNE-Untereinheiten einer *coiled-coil* Struktur bedienen, um so mit KCNQ- oder anderen Proteinen zu interagieren. Dazu sind bisher keine Erkenntnisse veröffentlicht worden.

Die Auswertung von Proteinsequenzen aus der NCBI Datenbank ergab für *KCNE2* eine erhöhte Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung zweier *coiled-coil* Domänen (Tab. 4.1). Für die anderen KCNE-Untereinheiten wurden derartige Strukturen nicht dermaßen deutlich vorhergesagt.

Protein	coiled-coil Wahrscheinlichkeit	
	vor TM	nach TM
KCNE1 ¹	-	0,120
KCNE2 ²	0,697	0,758
KCNE3 ³	0,145	-
KCNE4 ⁴	-	0,026
		0,276
KCNE5 ⁵	0,278	-

Tab. 4.1: Maximale *coiled-coil* Wahrscheinlichkeiten aller KCNE-Untereinheiten

Es wurden dabei Fenster von jeweils 14 aufeinanderfolgenden Aminosäuren analysiert. Die Transmembrandomäne wurde mit TM abgekürzt. Zugangsnummern der NCBI Datenbank: ¹NM_001127670 (Variante 1), NM_000219 (Variante 2), NM_001127668 (Variante 3) und NM_001127669 (Variante 4); ²NM_172201; ³NM_005472; ⁴NM_080671; ⁵EF535525. Für *KCNE4* ergeben sich zwei Bereiche mit erhöhter *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit nach der putativen Transmembrandomäne.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz von *KCNE2* aus verschiedenen Spezies zeigt, dass dieses Protein stark konserviert ist. Abb. 4.6 gibt die die möglichen a- und d-Positionen des *coiled-coil* Motivs wieder.

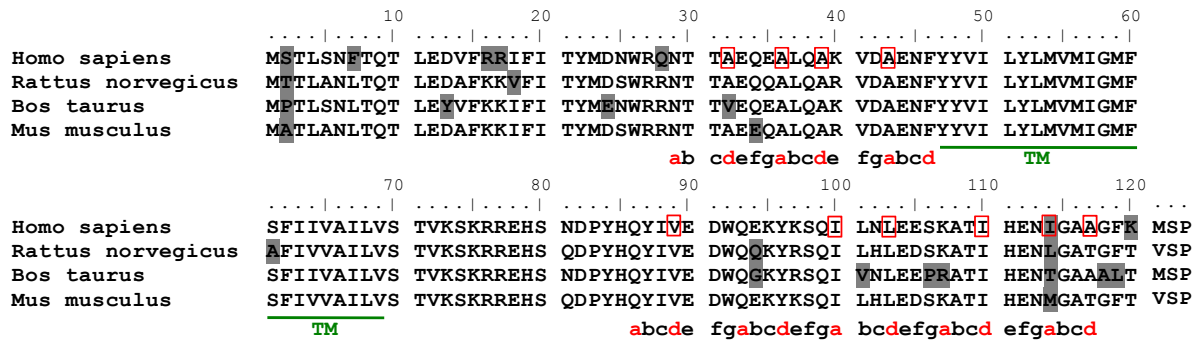


Abb. 4.6: Vergleich der Aminosäuresequenzen von *KCNE2* in verschiedenen Spezies

Die analysierten Sequenzen sind in der NCBI Datenbank unter den Zugangsnummern NM_172201 (*Homo sapiens*), BC089778 (*Rattus norvegicus*), BC111662 (*Bos taurus*) und NM_134110 (*Mus musculus*) zu finden. Die grau hinterlegten Positionen unterscheiden sich von den Aminosäuren der Mehrzahl der anderen Organismen an dieser Stelle. Das *coiled-coil* Motiv ist unter den Sequenzen eingezeichnet. Die hydrophoben Aminosäuren auf a- oder d-Positionen der humanen Sequenz sind rot markiert. Die Transmembranregion ist in grün mit TM markiert.

Bei den KCNE-Untereinheiten handelt es sich um Typ I-Transmembranproteine, welche alleine keine Ströme ausbilden können (Sanguinetti *et al.*, 1996; Tinel *et al.*, 2000 b; Angelo *et al.*, 2002; Manderfield *et al.*, 2009). Die Vorhersage der Transmembranverteilung von *KCNE2* zeigt eine extrazelluläre Lokalisation der ersten *coiled-coil* Domäne. Aufgrund ihrer α -helikalen Struktur könnte diese mit der direkt anschließenden Transmembranregion eine aus der Membran herausragende Verlängerung in den Extrazellularraum darstellen. Die zweite potenzielle *coiled-coil* Domäne von *KCNE2* liegt etwa 15 Aminosäuren nach der Transmembrandomäne und könnte aufgrund ihrer zytosolischen Lokalisation z.B. für die Interaktion mit der vergleichbar großen TCC2-Domäne der KCNQ-Kanäle zur Verfügung stehen.

Kang *et al.* (2008) zeigten im Modell eine mögliche Interaktion von *KCNQ1* und *KCNE1* innerhalb der Transmembranebene. Allerdings konnte Haitin (2008) darüber hinaus *KCNE1* mit der CTR von *KCNQ1* koimmunpräzipitieren, so dass die Wechselwirkung in der Trans-

membranebene nicht die einzige Interaktion darstellen kann. *KCNE1* weist im Gegensatz zu *KCNE2* nur geringe *coiled-coil* Wahrscheinlichkeiten auf (Tab. 4.1). Die Ausbildung von Dimeren und Tetrameren durch die TCC1-Domäne von *KCNQ3* zeigt, dass eine geringe *coiled-coil* Wahrscheinlichkeit keine Aussage über die Assemblierung zulässt.

KCNQ1 wird darüber hinaus auch von *KCNE2*, *KCNE3*, *KCNE4* und *KCNE5* reguliert (Tinel *et al.*, 2000 a; Schroeder *et al.*, 2000 a; Grunnet *et al.*, 2002; Angelo *et al.*, 2002). Manderfield *et al.* (2009) konnten zeigen, dass die CTR von *KCNE4* für die Inhibition von *KCNQ1* durch diese β -Untereinheit essentiell ist. Da *KCNE4* zwei intrazelluläre, potenzielle *coiled-coil* Domänen aufweist (Tab. 4.1), besteht die Möglichkeit, dass diese an der Interaktion mit *KCNQ1* beteiligt sind.

4.7 Ausblick

Um die bisher unbekannt Funktion der *coiled-coil* Domänen bei den KCNE-Proteinen zu klären, bietet sich die Mutation von kritischen a- oder d-Positionen des *coiled-coil* Motivs, wie bei der Untersuchung der TCC-Domänen in *KCNQ2* und *KCNQ3*, sowie deren Koexpression mit KCNQ-Kanälen an.

Die Strukturaufklärung der heteromerisierten *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* könnte das grundlegende Verständnis der Heteromerisierung der vollständigen Kanäle und des M-Stromes verbessern. Dabei bietet die Isolierung dieser Spezies über die unterschiedliche pH- und Salzempfindlichkeit einen hervorragenden Ansatzpunkt.

In diesem Zusammenhang könnte auch die gemeinsame, lösliche Expression beider Domänen mit Hilfe des pET Duet-Vektors erfolgen, so wie sie von Wiener *et al.* (2008) für die Analyse der Interaktion von *KCNQ1* mit CaM erfolgt ist. Auch die Regulation von *KCNQ2* und *KCNQ3* über CaM könnte mit diesem Ansatz untersucht werden.

Die Erweiterung der in dieser Arbeit erstellten Modelle der TCC2-Domänen der *KCNQ2*/*KCNQ3*-Heteromere auf die TCC1-Domäne sowie die Untersuchung von KCNQ-Kanälen mit unterschiedlich langen Schleifen zwischen den TCC-Domänen könnten dabei unterstützende Hinweise auf die regulierenden Bereiche bei der Heteromerisierung und deren Bedeutung im Zusammenhang mit bekannten Erkrankungen geben. Als Kandidaten kommen hierbei insbesondere die mögliche Koordination von Metallionen an den Histidinseitenketten der TCC2-Domäne von *KCNQ3*, die potenzielle *Nedd4-2* Ubiquitin Ligase-Bindestelle in der Schleife von *KCNQ3* und der Einfluss einer PPT-Aminosäuresequenz unmittelbar hinter der TCC2-Domäne von *KCNQ2* in Betracht.

5 Zusammenfassung

Die α -Untereinheiten der humanen, spannungsabhängigen KCNQ-Familie bilden wie alle Kaliumkanäle ein Tetramer aus, dessen korrekte Assemblierung von grundlegender Bedeutung für dessen Funktionalität ist. Dabei können die verschiedenen Familienmitglieder Homo- oder Heteromere ausbilden, dessen Spezifität vermutlich von der untereinheitenspezifischen Wechselwirkungsdomäne (*si*-Domäne) kontrolliert wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte die vorhergesagte Struktur der *si*-Domäne experimentell bestätigt werden. Diese bestand aus zwei α -helikalen TCC-Domänen, welche über eine flexible Schleife miteinander verbunden sind. Die TCC-Domänen konnten unabhängig voneinander parallele *coiled-coil* Bündel bilden. Es ergab sich somit insgesamt eine doppelte *coiled-coil* Struktur.

Die isolierte *si*-Domäne von *KCNQ2* bildete ein stabiles Tetramer aus, während die *si*-Domäne von *KCNQ3* zeitabhängig Dimere und Tetramere ausbildete. Dieses und andere Ergebnisse unterstützten dabei den postulierten Mechanismus der Dimerisierung von Dimeren zur Bildung der tetrameren KCNQ-Kanäle.

In der vorliegenden Arbeit konnten auch Unterschiede zwischen den Assemblierungseigenschaften der isolierten *si*- und TCC-Domänen gegenüber deren Bedeutung im vollständigen Kanal aufgezeigt werden. Während die TCC2-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* für die Homomerisierung der Kanäle nicht benötigt wird (Schwake *et al.*, 2006), war eine intakte TCC2-Domäne für die Tetramerisierung der isolierten *si*-Domänen ausreichend. Eine Interaktion der TCC1- mit der TCC2-Domäne konnte dabei nicht gezeigt werden.

Die isolierten *si*-Domänen von *KCNQ2* und *KCNQ3* zeigten verschiedene Hinweise auf eine Heterotetramerisierung miteinander, wobei die heteromeren Spezies noch nicht abschließend isoliert werden konnten. Heteromere *KCNQ2/KCNQ3*-Kanäle verursachen einen Teil des physiologisch bedeutenden M-Stromes im Gehirn. In der vorliegenden Arbeit wurden drei Bereiche in *KCNQ2* und *KCNQ3* identifiziert, denen dabei eine Bedeutung bei der Assemblierung homo- und heteromerer Kanäle zukommen könnte.

Für KCNE-Proteine, als β -Untereinheiten der KCNQ-Kanäle, wurden ferner *coiled-coil* Domänen vorhergesagt, über deren Bedeutung bisher keine Erkenntnisse vorliegen. Eine funktionelle Untersuchung dieser neu entdeckten Struktur und ihrer potenziellen Interaktion mit KCNQ α -Untereinheiten wird sicherlich Teil der weiteren Forschung werden.

6 Summary

The α -subunits of the human voltage-gated KCNQ family form tetramers, like all other potassium channels do. Their precise assembly is the basis for their functionality. The different family members can be composed of homotetramers and heterotetramers, which specificity is probably determined by the subunit interaction domain (*si* domain).

In the present thesis the predicted structure of the *si* domain could be confirmed. It contains two α -helical TCC domains, which are connected by a flexible loop. The TCC domains can form parallel coiled-coil bundles independently from each other. Therefore a tandem coiled-coil structure occurs.

The isolated *si* domain of *KCNQ2* assembles as stable tetramers, whereas the isolated *si* domain of *KCNQ3* forms dimers and tetramers in a time dependent manner. This result and other findings support the postulated mechanism of dimerisation of dimers for the assembly of tetrameric KCNQ channels.

However, differences in the assembly of the isolated *si* domains and TCC domains regarding their properties in the full-length channels could also be detected. Whereas the TCC2 domain is dispensable for the homomerisation of *KCNQ2* and *KCNQ3* (Schwake *et al.*, 2006), an intact TCC2 domain was sufficient for the tetramerisation of the isolated *si* domains. Thereby an interaction between the TCC1 and TCC2 domain could not be demonstrated.

The isolated *si* domains of *KCNQ2* and *KCNQ3* gave several hints indicating that they may undergo heteromerisation, unfortunately the heteromeric species itself could not be isolated. Heteromeric *KCNQ2/KCNQ3* channels are known to generate part of the physiologically important *M current* in the brain. In the present thesis three regions in *KCNQ2* and *KCNQ3* could be localised which might influence the assembly of homo- and heteromeric channels.

Sequences analysis of KCNE proteins predicted coiled-coil domains for these β -subunits of KCNQ channels. So far nothing is known about the function of their coiled-coil domains. Further investigation of this newly depicted structure and their potential interaction with KCNQ α -subunits should be part of ongoing research.

7 Anhang

I KCNQ-Aminosäuresequenzen

Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten KCNQ-Aminosäuresequenzen.

Gekennzeichnet sind die TCC-Domänen sowie die a- und d-Positionen des *coiled-coil* Motivs (rot), die Calmodulin-Bindemotive (blaue Kästchen), die untersuchten Deletionen bei *KCNQ1* bis *KCNQ4* (grüne Kästchen), die Leucin/Prolin Mutationen bei *KCNQ2* und *KCNQ3* (violett), die isolierten TCC-Peptide bei *KCNQ3* (gelbe Linien), die Start- und Endaminosäuren ausgewählter Konstrukte bei *KCNQ2* und *KCNQ3* (schwarz), die Split-Positionen bei *KCNQ2* (graue Pfeile), der Beginn der C-terminalen Region (CTR, schwarz) und der mittels *Molecular Modeling* untersuchte Bereich bei *KCNQ2* bis *KCNQ4* (grau). Der dabei kritische Phenylalaninrest von *KCNQ3* ist ebenfalls gekennzeichnet (grauer Kreis).

KCNQ1 Aminosäuresequenz

```

      10          20          30          40          50          60
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAAASSPPRA ERKRWGWGRL PGARRGSAGL AKKCPFSLEL AEGGPAGGAL YAPIAPGAPG

      70          80          90          100         110         120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
PAPPASPAAP AAPPVASDLG PRPPVSLDPR VSIYSTRRPV LARTHVQGRV YNFLERPTGW

     130         140         150         160         170         180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KCFVYHFAVF LIVLVCLIFS VLSTIEQYAA LATGTLFWME IVLVVFFGTE YVRLWSAGC

     190         200         210         220         230         240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
RSKYVGLWGR LRFARKPISI IDLIVVASM VVLCVGSKGQ VFATSAIRGI RFLQILRMLH

     250         260         270         280         290         300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
VDRQGGTWRL LGSVVFHRQ ELITTLYIGF LGLIFSSYFV YLAEKDAVNE SGRVEFGSYA

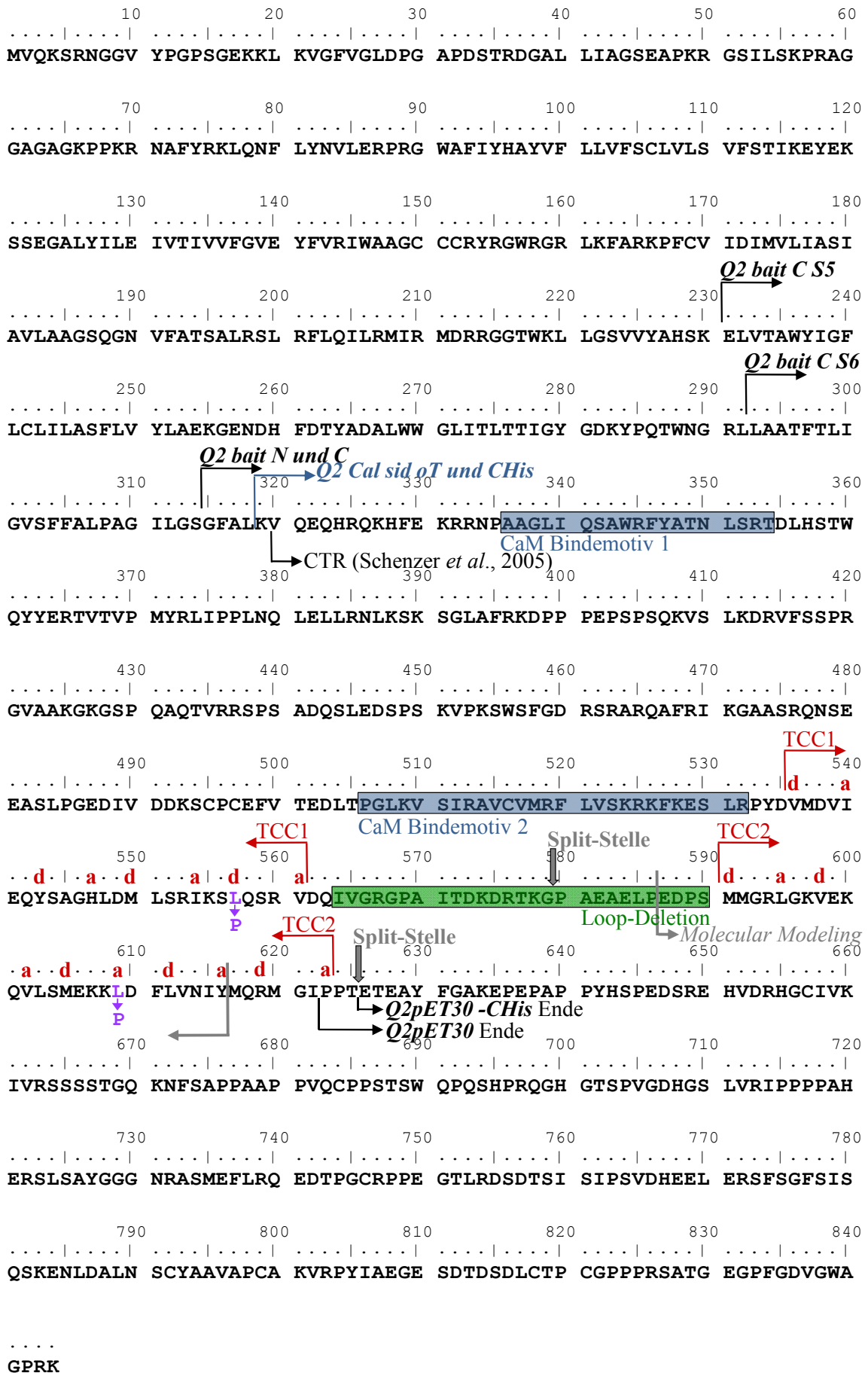
     310         320         330         340         350         360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DALWGWVTV TTIGYGDKVP QTWVGKTIAS CFSVFAISFF ALPAGILGSG FALKVQQKQR
                                     CTR (Schenzer et al., 2005) ↓
     370         380         390         400         410         420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
QKHFNRQIPA AASLIQTAWR CYAAENPDS TWKIYIRKAP RSHTLLSPSP KPKKSVVVKK
      CaM Bindemotiv 1

     430         440         450         460         470         480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KKFKLDKDNQ VTPGEKMLTV PHITCDPPEE RRLDHFSVDG YDSSVRKSPT LLEVSMPHFM
                                     TCC1
     490         500         510         520         530         540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
RTNSFAEDLD LEGETLLTPI THISQLREHH RATIKVIRRM QYFVAKKKFQ QARK PYDVVD
      CaM Bindemotiv 2
     550         560         570         580         590         600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
. a . . d . . a | . d . . a . . d | . a . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . |
VIEQYSQGH L NLMVRIKELQ RRLDQ SIGKP SLFISVSEKS KDRGSNT IGA RLNRVEDKVT
      Loop-Deletion
     610         620         630         640         650         660
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
. d . . a . . d | . . a . . d . . a | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . |
QLDQRLALIT DMLHQLLSLH GGSTPGSGGP PREGGAHITQ PCGSGGSVDP ELFLPSNTLP

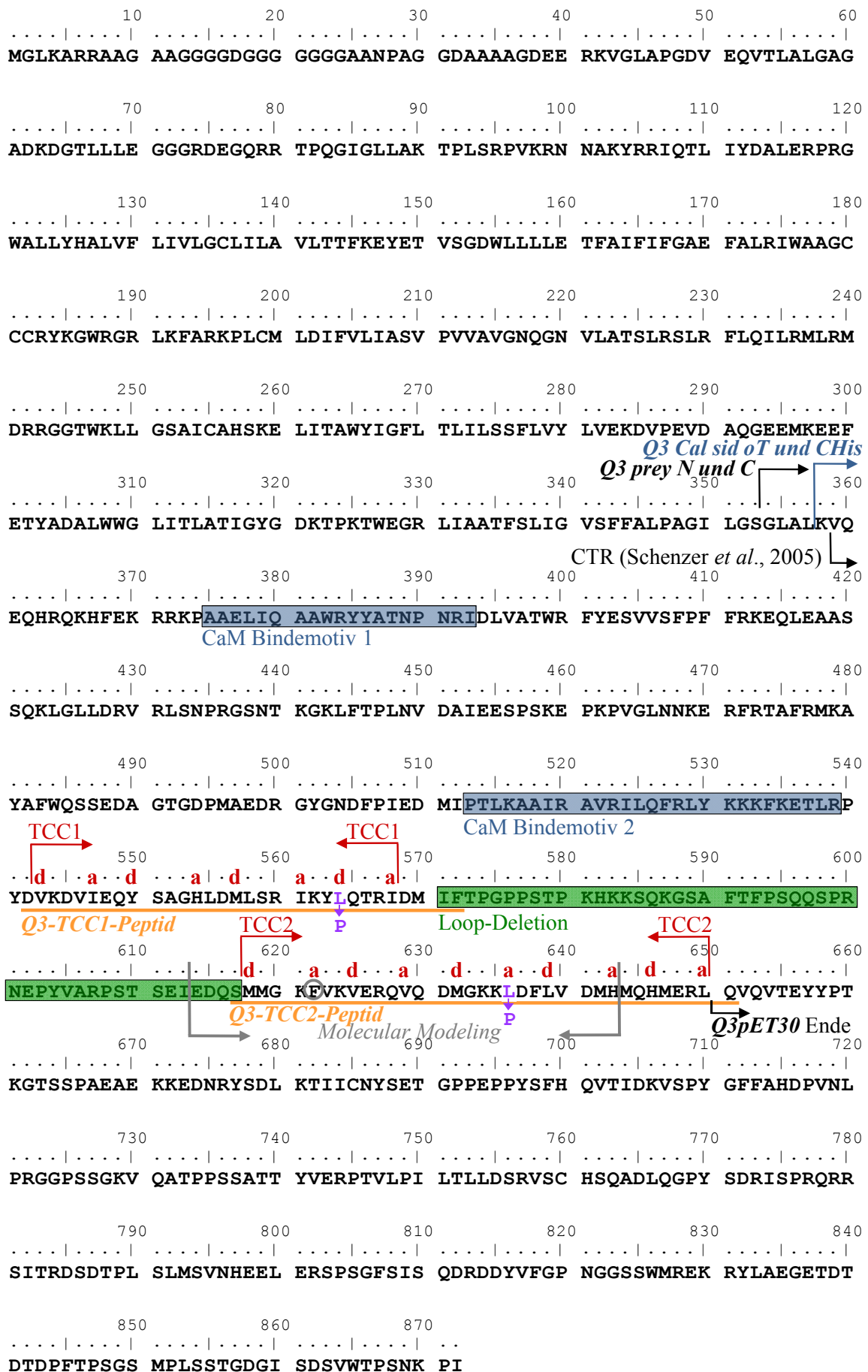
     670
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TYEQLTVPRR GPDEGS

```

KCNQ2 Aminosäuresequenz



KCNQ3 Aminosäuresequenz



KCNQ5 Aminosäuresequenz

```

      10          20          30          40          50          60
      |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
MKDVESGRGR VLLNSAAARG DGLLLLGTRA ATLGGGGGGL RESRRGKQGA RMsLLGKPLS

      70          80          90          100         110         120
      |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
YTSSQSCR RN VKYRRVQNYL YNVLERPRGW AFIYHAFVFL LVFGCLILSV FSTIPEHTKL

      130         140         150         160         170         180
      |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
ASSCLLILEF VMIVVFGLEF IIRIWSAGCC CRYRGWQGR LRFARKPFCVI DTIVLIASIA

      190         200         210         220         230         240
      |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
VVSAKTQGN I FATSALRSLR FLQILRMVRM DRGGT WKLL GSVVYAHSKE LITAWYIGFL

      250         260         270         280         290         300
      |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
VLIFSSFLVY LVEKDANKEF STYADALWWG TITLTTIGYG DKTPLTWLGR LLSAGFALLG

      310         320         330         340         350         360
      |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
ISFFALPAG I LGSGFALKVQ EQHRQKHFEK RRNFAANLIQ CVWRSYAADE KSVSIATWKP
      |
      |→ CTR (Schenzer et al., 2005)
      |
      | CaM Bindemotiv I
      |
      370         380         390         400         410         420
      |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
HLKALHTCSP TKKEQGEASS SQKLSFKERV RMASPRGQSI KSRQASVGDR RSPSTDITAE

      430         440         450         460         470         480
      |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
GSPTKVQKSW SFNDRTRFRP SLRLKSSQPK PVIDADTALG TDDVYDEKGC QCDVSVEDLT

      490         500         510         520         530         540
      |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
PPLKTVIRAI RIMKFHVAKR KFKETLR PYD VKDVIEQYSA GHLDMLCRIK SLQTRVDQIL
      |
      | CaM Bindemotiv 2
      |
      550         560         570         580         590         600
      |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
GKGQITSDKK SREKITA EHE TTDDL SMLGR VVKVEKQVQS IESKLDCLLD IYQQVLRKGS

      610         620         630         640         650         660
      |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
ASALALASFQ IPPFECEQTS DYQSPVDSKD LSGSAQNSGC LSRSTSANIS RGLQFILTPN

      670         680         690         700         710         720
      |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
EFSAQTFYAL SPTMHSQATQ VPISQSDGSA VAANTIANQ INTAPKPAAP TTLQIPPLP

      730         740         750         760         770         780
      |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
AIKHLRP PET LHPNPAGLQE SISDVT TCLV ASKENVQVAQ SNLTKDRSMR KSFDMGGETL

      790         800         810         820         830         840
      |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
LSVCPMVPKD LGKSLSVQNL IRSTEELNIQ LSGSESSGSR GSQDFY PKWR ESKLFITDEE

      850         860         870         880         890
      |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
VGPEETETDT FDAAPQ PARE AAFASDSLRT GRSRSSQSIC KAGESTDALS LPHVKLK

```


II Eichgeraden der Größenausschlusschromatographie (SEC)

Säule	pH-Wert	Eichgerade	Ausschlussvolumen
Superdex 75 ¹	pH 11	$y = -37,278 x + 231,82$ $R^2 = 0,9939$	43,7 ml
Superdex 75 ²	pH 11	$y = -37,33 x + 219,72$ $R^2 = 0,9885$	32,7 ml
Superdex 75 ³	pH 11	$y = -36,623 x + 216,8$ $R^2 = 0,9811$	32,7 ml
Superdex 75	pH 12	$y = -39,407 x + 224,77$ $R^2 = 0,9697$	32,1 ml
Superdex 200	pH 11	$y = -29,447 x + 211,54$ $R^2 = 0,9833$	42,7 ml
Superdex 200	pH 12	$y = -28,398 x + 201,99$ $R^2 = 0,9004$	43,8 ml
Superdex Peptide	pH 11	$y = -6,49 x + 38,018$ $R^2 = 0,9863$	8,8 ml
Superdex Peptide	pH 12	$y = -6,4892 x + 38,031$ $R^2 = 0,9811$	9,0 ml

¹ Diese Eichgerade wurde verwendet für die Abbildungen 3.7, 3.9, 3.13 C, 3.15 sowie 3.21 C und D.

² Diese Eichgerade wurde verwendet für die Abbildung 3.10.

³ Diese Eichgerade wurde verwendet für die Abbildungen 3.21 A, 3.22, 3.23 A, 3.30 A.

y: Laufvolumen in ml
 x: lg (Da)
 R²: Bestimmtheitsmaß

III Oligonukleotid-Sequenzen

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')	Orientierung und Größe
Q2pET30 fw	GCGGTACCGACGACGACGACAAGGTGATGGACGTCATCGA GCAG	forward, 44 bp
Q2 reverse	CCGCTCGAGTCAGATGCCCATCCGCTGCATG	reverse, 31 bp
Q3pET30 fw	GCGGTACCGACGACGACGACAAGGTGAAGGATGTGATTGA GCAG	forward, 44 bp
Q3 reverse	CCGCTCGAGTCACAACCGTTCCATGTGTTGC	reverse, 31 bp
pET lacop h	GTGAGCGGATAACAATTCC	forward, 19bp
Q2oTpET30	CGCCATATGGTGATGGACGTCATCGAGCAG	forward, 30 bp
Q3oTpET30	CGCCATATGGTGAAGGATGTGATTGAGCAG	forward, 30 bp
Q3oTpET30 Fusion fw	CCCAGGAATGAACCGTATGTAGCCAGACC	forward, 29 bp
Q3oTpET30 Fusion rev	GGTCTGGCTACATACGGTTCATTCTGGG	reverse, 29 bp
upstr. pET30 Sequenz.	CATCGGTGATGTCGGC	forward, 16 bp
HA-Tag forward	TACCCATACGACGTCCAGACTACGCTTCTTCTGGTCTGGT G	forward, 42 bp
HA-Tag reverse	AGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTACATATGTATATCTC C	reverse, 42 bp
Q2-C-His reverse	CCGCTCGAGTCAATGATGATGATGATGGTGTGTCTGGGGGG ATGCCCATCC	reverse, 50 bp
C-tagged Q2pET30 fw	CGATAGCACATATGGTGATGGACGTCATCGAGCAG	forward, 35 bp
T7 Terminator rv	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	reverse, 19 bp
Q3_L564P_h	GATAAAGTACCTGCAGACGAGAATAG	forward, 26 bp
Q3_L564P_r	CTATTCTCGTCTGCAGGTACTTTATC	reverse, 26 bp
Q3_L636P_h	GGGAAGAAGCCGGACTTCCTCGTGG	forward, 25 bp
Q3_L636P_r	CCACGAGGAAGTCCGGCTTCTTCCC	reverse, 25 bp
Calmodulin Q2 forward	CGATAGCACATATGAAGGTTTCAGGAGCAGCACAGGC	forward, 36 bp
Calmodulin Q3 forward	CGATAGCACATATGAAGGTGCAGGAGCAACACCG	forward, 34 bp
CaM Q2 L437 forward	CGACCAGAGCCTGGAGGACAGCCCCAGC	forward, 28 bp
CaM Q2 L437 reverse	GCTGGGGCTGTCTCCAGGCTCTGGTCG	reverse, 28 bp
CaM Q3 P603 forward	CCCAGGAATGAACCGTATGTAGCCAGACC	forward, 29 bp
CaM Q3 P603 reverse	GGTCTGGCTACATACGGTTCATTCTGGG	reverse, 29 bp
Q1 del Loop fw	GCAGAGGAGGCTGGACCAGATCGGCGCC	forward, 28 bp
Q1 del Loop rv	GGTTCAGGCGGGCGCCGATCTGGTCCAGC	reverse, 29 bp
Q2 del Loop fw	GCAGTCCAGAGTGGACCAGATGATGGGAC	forward, 29 bp

Anhang

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')	Orientierung und Größe
Q2 del Loop rv	CCGAGCCGTCCCATCATCTGGTCCAC	reverse, 26 bp
Q3 del Loop fw	CAGACGAGAATAGATATGATGATGGG	forward, 26 bp
Q3 del Loop rv	TTACAAACTTCCCCATCATCATATCTATTC	reverse, 30 bp
Q4 del TCC2 SacI fw	GTGTGAGCTCACGGTGGACGACATC	forward, 25 bp
KCNQ4 del TCC2 rv	CCCAGGCTGGCCGAGGTGCTGATTC	reverse, 26 bp
Q2 bait N fw	GCAGGGCCATTACGGCCGGGTTTGCCCTGAAGGTCAGG	forward, 39 bp
Q2 bait N rev	CCATGGGGCCCGAGGCGGCCTACTTCTGGGCCCCGGCCC	reverse, 38 bp
Q2 bait C fw	AGACGGCCATTACGGCCAAAAATGGGGTTTGCCCTGAAGG	forward, 40 bp
Q2 bait C rev	CCATGGGGCCCGAGGCGGCCTTCTGGGCCCCGGCCCAGCC	reverse, 39 bp
Q3 prey N fw	AGAGTGGCCATTACGGCCGGGCTGGCCCTCAAGG	forward, 34 bp
Q3 prey N rev	CTCGAGAGGCCGAGGCGGCCTAAATGGGCTTATTGGAAGG	reverse, 40 bp
Q3 prey C fw	CAGAGTGGCCATTACGGCCAAAAATGGGGCTGGCCCTCAA GG	forward, 42 bp
Q3 prey C rev	TCGAGAGGCCGAGGCGGCCGAAATGGGCTTATTGGAAGG	reverse, 39 bp
NK 36	CACCCTTGATGCGGAAAGCCTGG	reverse, 23 bp
Q2 bait S5 C fw	AGACGGCCATTACGGCCAAAAATGGAGCTGGTCACTGC	forward, 38 bp
Q2 bait S6 C fw	AGACGGCCATTACGGCCAAAAATGCTTGC GGCAACCTTCA C	forward, 41 bp
Q1 sid seq1	CATGGAGGTGCTATGCTG	forward, 18 bp
Q1_6h	CATGGAGGTGCTATGCTGC	forward, 19 bp
NK 23	CCACCAACCTCTCGCGCACAGACCTGC	forward, 27 bp
Q3_03h	GGGAAGGCCGTCTGATTG	forward, 18 bp
pF3R	GAGACTCCATTTCGGGTGTTCT	reverse, 21 bp
Q1_sid_seq	CCATCGGGCCACCATTA	forward, 18 bp
NK 24	CCAGGCTTCCGCATCAAGGG	forward, 21 bp
O4h	CAACCCCAACAGGATTGACC	forward, 20 bp
08h	GAGACAGTGACACACCTC	forward, 18 bp
07h	GACCATTGACAAAGTCAG	forward, 18 bp
Q1_5h	GTGGGTCGGGAAGACCATCG	forward, 20 bp
Q3_06h	CACAAGAAGTCTCAGAAAG	forward, 19 bp
NK 27	GGACGTCATCGAGCAGTACTC	forward, 21 bp

IV Absorptionskoeffizienten und Molekulargewichte

Protein bzw. Peptid	Molarer bzw. spezifischer Absorptionskoeffizient	Molekulargewicht in Da
Q2oTpET30	$\epsilon_{280} = 2980 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	9.922
Q2pET30	$\epsilon_{280} = 2980 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	14.577
Q2-TCC1 _{LzuP}	$\epsilon_{280} = 2980 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	14.561
Q2-TCC2 _{LzuP}	$\epsilon_{280} = 2980 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	14.561
Q2-TCC1+2 _{LzuP}	$\epsilon_{280} = 2980 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	14.545
Q2pET30-CHis	$\epsilon_{280} = 2980 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	11.040
Q2-TCC1 _{LzuP} -CHis	$\epsilon_{280} = 2980 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	11.024
Q2-TCC2 _{LzuP} -CHis	$\epsilon_{280} = 2980 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	11.024
Q2-TCC1+2 _{LzuP} -CHis	$\epsilon_{280} = 2980 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	11.008
Q3oTpET30	$\epsilon_{280} = 4470 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	12.629
Q3pET30	$\epsilon_{280} = 4470 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	17.284
Q3-TCC1 _{LzuP}	$\epsilon_{280} = 4470 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	17.268
Q3-TCC2 _{LzuP}	$\epsilon_{280} = 4470 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	17.268
Q3-TCC1+2 _{LzuP}	$\epsilon_{280} = 4470 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	17.252
Q3pET30-HA	$\epsilon_{280} = 8940 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	17.545
Q2 Cal sid oT	$\epsilon_{280} = 28420 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	37.306
Q2 Cal sid CHis	$\epsilon_{280} = 28420 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	38.424
Q3 Cal sid oT	$\epsilon_{280} = 31400 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	34.214
Q3 Cal sid CHis	$\epsilon_{280} = 31400 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	35.392
Q3-TCC1-Peptid	$Q = 31,405 \text{ [ml} \cdot \text{mg}^{-1}]$	3.699
Q3-TCC2-Peptid	$Q = 31,815 \text{ [ml} \cdot \text{mg}^{-1}]$	4.252

8 Literaturverzeichnis

- Abriel H, Staub O. 2005. Ubiquitylation of ion channels. *Physiology (Bethesda)* 20:398-407.
- Alber T. 1992. Structure of the leucine zipper. *Curr Opin Genet Dev* 2:205-210.
- Amersham Pharmacia, GE Healthcare. 2006. *Handbook Gel Filtration Principles and Methods*. Uppsala, Sweden.
- Angelo K, Jespersen T, Grunnet M, Nielsen MS, Klaerke DA, Olesen SP. 2002. KCNE5 induces time- and voltage-dependent modulation of the KCNQ1 current. *Biophys J* 83:1997-2006.
- Ashcroft FM. 2000. *Ion channels and Disease*. Academic Press.
- Attali B. 2002. Human congenital long QT syndrome: more than previously thought? *Trends Pharmacol Sci* 23:249-251.
- Attali B, Lesage F, Ziliani P, Guillemare E, Honore E, Waldmann R, Hugnot JP, Mattei MG, Lazdunski M, Barhanin J. 1993. Multiple mRNA isoforms encoding the mouse cardiac Kv1-5 delayed rectifier K⁺ channel. *J Biol Chem* 268:24283-24289.
- Bal M, Zhang J, Zaika O, Hernandez CC, Shapiro MS. 2008 a. Homomeric and heteromeric assembly of KCNQ (Kv7) K⁺ channels assayed by total internal reflection fluorescence/fluorescence resonance energy transfer and patch clamp analysis. *J Biol Chem* 283:30668-30676.
- Bal M, Zaika O, Martin P, Shapiro MS. 2008 b. Calmodulin binding to M-type K⁺ channels assayed by TIRF/FRET in living cells. *J Physiol* 586:2307-2320.
- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. 1996. K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 384:78-80.
- Beimgraben C. 2007. *Assemblierung und Pharmakologie von spannungsabhängigen KCNQ (Kv7) K⁺ Kanälen*. Dissertation. Biochemisches Institut der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- Belgareh-Touze N, Leon S, Erpapazoglou Z, Stawiecka-Mirota M, Urban-Grimal D, Haguener-Tsapis R. 2008. Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. *Biochem Soc Trans* 36:791-796.
- Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK. 1998. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279:403-406.
- Bjellqvist B, Basse B, Olsen E, Celis JE. 1994. Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis* 15:529-539.
- Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasquali C, Paquet N, Ravier F, Sanchez JC, Frutiger S, Hochstrasser D. 1993. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14:1023-1031.
- Boehmer C, Palmada M, Rajamanickam J, Schniepp R, Amara S, Lang F. 2006. Post-translational regulation of EAAT2 function by co-expressed ubiquitin ligase Nedd4-2 is impacted by SGK kinases. *J Neurochem* 97:911-921.
- Brown DA, Adams PR. 1980. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* 283:673-676.
- Buck MA, Olah TA, Weitzmann CJ, Cooperman BS. 1989. Protein estimation by the product of integrated peak area and flow rate. *Anal Biochem* 182:295-299.
- Bullock WO, Fernandez JM, Stuart JM. 1987. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5.
- Cabrita LD, Bottomley SP. 2004. Protein expression and refolding--a practical guide to getting the most out of inclusion bodies. *Biotechnol Annu Rev* 10:31-50.

- Carson M. 1997. Ribbons. *Methods Enzymol* 277:493-505.
- Catterall WA. 1986. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu Rev Biochem* 55:953-985.
- Cha A, Snyder GE, Selvin PR, Bezanilla F. 1999. Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature* 402:809-813.
- Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, Leppert M. 1998. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet* 18:53-55.
- Chen GC, Yang JT. 1977. Two-point calibration of circular dichrometer with d-10-camphorsulfonic acid. *Anal Lett* 10:1195-1207.
- Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY, Jin HW, Sun H, Su XY, Zhuang QN, Yang YQ, Li YB, Liu Y, Xu HJ, Li XF, Ma N, Mou CP, Chen Z, Barhanin J, Huang W. 2003 a. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 299:251-254.
- Chen H, Kim LA, Rajan S, Xu S, Goldstein SA. 2003 b. Charybdotoxin binding in the I(Ks) pore demonstrates two MinK subunits in each channel complex. *Neuron* 40:15-23.
- Clapham DE, Runnels LW, Strubing C. 2001. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2:387-396.
- Cooper EC, Aldape KD, Abosch A, Barbaro NM, Berger MS, Peacock WS, Jan YN, Jan LY. 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* 97:4914-4919.
- Covarrubias M, Bhattacharji A, De Santiago-Castillo JA, Dougherty K, Kaulin YA, Na-Phuket TR, Wang G. 2008. The neuronal Kv4 channel complex. *Neurochem Res* 33:1558-1567.
- Crick FHC. 1952. Is alpha-keratin a coiled coil? *Nature* 170:882-883.
- Crick FHC. 1953. The packing of a-helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallogr.* 6:689-698.
- del Camino D, Holmgren M, Liu Y, Yellen G. 2000. Blocker protection in the pore of a voltage-gated K⁺ channel and its structural implications. *Nature* 403:321-325.
- Devaux JJ, Kleopa KA, Cooper EC, Scherer SS. 2004. KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *J Neurosci* 24:1236-1244.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77.
- Dumont JN. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136:153-179.
- Durell SR, Guy HR. 1992. Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels. *Biophys J* 62:238-247; discussion 247-250.
- Ekberg J, Schuetz F, Boase NA, Conroy SJ, Manning J, Kumar S, Poronnik P, Adams DJ. 2007. Regulation of the voltage-gated K(+) channels KCNQ2/3 and KCNQ3/5 by ubiquitination. Novel role for Nedd4-2. *J Biol Chem* 282:12135-12142.
- Elinder F, Nilsson J, Arhem P. 2007. On the opening of voltage-gated ion channels. *Physiol Behav* 92:1-7.
- Fotia AB, Ekberg J, Adams DJ, Cook DI, Poronnik P, Kumar S. 2004. Regulation of neuronal voltage-gated sodium channels by the ubiquitin-protein ligases Nedd4 and Nedd4-2. *J Biol Chem* 279:28930-28935.
- Gamper N, Stockand JD, Shapiro MS. 2003. Subunit-specific modulation of KCNQ potassium channels by Src tyrosine kinase. *J Neurosci* 23:84-95.
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. 2003. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31:3784-3788.

- Glover JN, Harrison SC. 1995. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 373:257-261.
- Goetz H, Kuschel M, Wulff T, Sauber C, Miller C, Fisher S, Woodward C. 2004. Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination. *J Biochem Biophys Methods* 60:281-293.
- Grigoryan G, Keating AE. 2008. Structural specificity in coiled-coil interactions. *Curr Opin Struct Biol* 18:477-483.
- Grunnet M, Jespersen T, Rasmussen HB, Ljungstrom T, Jorgensen NK, Olesen SP, Klaerke DA. 2002. KCNE4 is an inhibitory subunit to the KCNQ1 channel. *J Physiol* 542:119-130.
- Gulbis JM, Zhou M, Mann S, MacKinnon R. 2000. Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. *Science* 289:123-127.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X. 2005. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:473-508.
- Hadley JK, Passmore GM, Tatulian L, Al-Qatari M, Ye F, Wickenden AD, Brown DA. 2003. Stoichiometry of expressed KCNQ2/KCNQ3 potassium channels and subunit composition of native ganglionic M channels deduced from block by tetraethylammonium. *J Neurosci* 23:5012-5019.
- Haitin Y, Attali B. 2008. The C-terminus of Kv7 channels: a multifunctional module. *J Physiol* 586:1803-1810.
- Harvey KF, Kumar S. 1999. Nedd4-like proteins: an emerging family of ubiquitin-protein ligases implicated in diverse cellular functions. *Trends Cell Biol* 9:166-169.
- Heginbotham L, Abramson T, MacKinnon R. 1992. A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science* 258:1152-1155.
- Heginbotham L, MacKinnon R. 1993. Conduction properties of the cloned Shaker K⁺ channel. *Biophys J* 65:2089-2096.
- Henke G, Maier G, Wallisch S, Boehmer C, Lang F. 2004. Regulation of the voltage gated K⁺ channel Kv1.3 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *J Cell Physiol* 199:194-199.
- Hesse M, Meier H, Zeeh B. 1995. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Hille B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*.
- Hille B, Armstrong CM, MacKinnon R. 1999. Ion channels: from idea to reality. *Nat Med* 5:1105-1109.
- Hoshi N, Zhang JS, Omaki M, Takeuchi T, Yokoyama S, Wanaverbecq N, Langeberg LK, Yoneda Y, Scott JD, Brown DA, Higashida H. 2003. AKAP150 signaling complex promotes suppression of the M-current by muscarinic agonists. *Nat Neurosci* 6:564-571.
- Howard RJ, Clark KA, Holton JM, Minor DL, Jr. 2007. Structural insight into KCNQ (Kv7) channel assembly and channelopathy. *Neuron* 53:663-675.
- Jenke M, Sanchez A, Monje F, Stuhmer W, Weseloh RM, Pardo LA. 2003. C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. *Embo J* 22:395-403.
- Jentsch TJ. 2000. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 1:21-30.
- Jespersen T, Membrez M, Nicolas CS, Pitard B, Staub O, Olesen SP, Baro I, Abriel H. 2007. The KCNQ1 potassium channel is down-regulated by ubiquitylating enzymes of the Nedd4/Nedd4-like family. *Cardiovasc Res* 74:64-74.

- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. 2003 a. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423:33-41.
- Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R. 2003 b. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423:42-48.
- Johnsson N, Varshavsky A. 1994. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10340-10344.
- Kamb A, Iverson LE, Tanouye MA. 1987. Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel. *Cell* 50:405-413.
- Kanaumi T, Takashima S, Iwasaki H, Itoh M, Mitsudome A, Hirose S. 2008. Developmental changes in KCNQ2 and KCNQ3 expression in human brain: possible contribution to the age-dependent etiology of benign familial neonatal convulsions. *Brain Dev* 30:362-369.
- Kanelis V, Bruce MC, Skrynnikov NR, Rotin D, Forman-Kay JD. 2006. Structural determinants for high-affinity binding in a Nedd4 WW3* domain-Comm PY motif complex. In: *Structure*. pp 543-553.
- Kang C, Tian C, Sonnichsen FD, Smith JA, Meiler J, George AL, Jr., Vanoye CG, Kim HJ, Sanders CR. 2008. Structure of KCNE1 and implications for how it modulates the KCNQ1 potassium channel. *Biochemistry* 47:7999-8006.
- Kanki H, Kupersmidt S, Yang T, Wells S, Roden DM. 2004. A structural requirement for processing the cardiac K⁺ channel KCNQ1. *J Biol Chem* 279:33976-33983.
- Kaupp UB. 1991. The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium. *Trends Neurosci* 14:150-157.
- Kharkovets T, Hardelin JP, Safieddine S, Schweizer M, El-Amraoui A, Petit C, Jentsch TJ. 2000. KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4333-4338.
- Kobertz WR, Miller C. 1999. K⁺ channels lacking the 'tetramerization' domain: implications for pore structure. *Nat Struct Biol* 6:1122-1125.
- Kohler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J, Adelman JP. 1996. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 273:1709-1714.
- Kosolapov A, Deutsch C. 2003. Folding of the voltage-gated K⁺ channel T1 recognition domain. *J Biol Chem* 278:4305-4313.
- Kosolapov A, Tu L, Wang J, Deutsch C. 2004. Structure acquisition of the T1 domain of Kv1.3 during biogenesis. *Neuron* 44:295-307.
- Kreusch A, Pfaffinger PJ, Stevens CF, Choe S. 1998. Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature* 392:945-948.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305:567-580.
- Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lutjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C, Jentsch TJ. 1999. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96:437-446.
- Kumar S, Tomooka Y, Noda M. 1992. Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 185:1155-1161.
- Kwon Y, Hofmann T, Montell C. 2007. Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6. *Mol Cell* 25:491-503.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

- Lee TE, Philipson LH, Kuznetsov A, Nelson DJ. 1994. Structural determinant for assembly of mammalian K⁺ channels. *Biophys J* 66:667-673.
- Lerche C, Scherer CR, Seeböhm G, Derst C, Wei AD, Busch AE, Steinmeyer K. 2000. Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J Biol Chem* 275:22395-22400.
- Li H, Li N, Shen L, Jiang H, Yang Q, Song Y, Guo J, Xia K, Pan Q, Tang B. 2008. A novel mutation of KCNQ3 gene in a Chinese family with benign familial neonatal convulsions. *Epilepsy Res* 79:1-5.
- Li M, Jan YN, Jan LY. 1992. Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* 257:1225-1230.
- Li Y, Gamper N, Hilgemann DW, Shapiro MS. 2005. Regulation of Kv7 (KCNQ) K⁺ channel open probability by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* 25:9825-9835.
- Lindström J, Schoepfer R, Whiting P. 1987. Molecular studies of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor family. *Mol Neurobiol* 1:281-337.
- Liu J, Rost B. 2001. Comparing function and structure between entire proteomes. *Protein Sci* 10:1970-1979.
- Liu J, Zheng Q, Deng Y, Cheng CS, Kallenbach NR, Lu M. 2006. A seven-helix coiled coil. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15457-15462.
- Liu J, Zheng Q, Deng Y, Li Q, Kallenbach NR, Lu M. 2007. Conformational specificity of the lac repressor coiled-coil tetramerization domain. *Biochemistry* 46:14951-14959.
- Löffler, Petrides. 2003. *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin: Springer.
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. 2005 a. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309:903-908.
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. 2005 b. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309:897-903.
- Lorenz C, Pusch M, Jentsch TJ. 1996. Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13362-13366.
- Lottspeich F, Zorbas H. 1998. *Bioanalytik*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Lupas A. 1996 a. Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol* 266:513-525.
- Lupas A. 1996 b. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* 21:375-382.
- Lupas A, Van Dyke M, Stock J. 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252:1162-1164.
- Lupas AN, Gruber M. 2005. The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv Protein Chem* 70:37-78.
- Maljevic S, Lerche C, Seeböhm G, Alekov AK, Busch AE, Lerche H. 2003. C-terminal interaction of KCNQ2 and KCNQ3 K⁺ channels. *J Physiol* 548:353-360.
- Manderfield LJ, Daniels MA, Vanoye CG, George AL, Jr. 2009. KCNE4 domains required for inhibition of KCNQ1. *J Physiol* 587:303-314.
- Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR, Kass RS. 2002. Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* 295:496-499.
- McCrossan ZA, Abbott GW. 2004. The MinK-related peptides. *Neuropharmacology* 47:787-821.
- Miller C. 2000. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol* 1: REVIEWS 0004.
- Murata Y, Iwasaki H, Sasaki M, Inaba K, Okamura Y. 2005. Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* 435:1239-1243.

- Nagaya N, Papazian DM. 1997. Potassium channel alpha and beta subunits assemble in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 272:3022-3027.
- Naik RR, Kirkpatrick SM, Stone MO. 2001. The thermostability of an alpha-helical coiled-coil protein and its potential use in sensor applications. *Biosens Bioelectron* 16:1051-1057.
- Nakajo K, Kubo Y. 2008. Second coiled-coil domain of KCNQ channel controls current expression and subfamily specific heteromultimerization by salt bridge networks. *J Physiol* 586:2827-2840.
- Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, Barhanin J, Faure S, Gary F, Coumel P, Petit C, Schwartz K, Guicheney P. 1997. A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet* 15:186-189.
- Nicholls A, Sharp KA, Honig B. 1991. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* 11:281-296.
- Niepmann M, Zheng J. 2006. Discontinuous native protein gel electrophoresis. *Electrophoresis* 27:3949-3951.
- Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, et al. 1984. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312:121-127.
- Ohya S, Sergeant GP, Greenwood IA, Horowitz B. 2003. Molecular variants of KCNQ channels expressed in murine portal vein myocytes: a role in delayed rectifier current. *Circ Res* 92:1016-1023.
- Okada M, Zhu G, Hirose S, Ito KI, Murakami T, Wakui M, Kaneko S. 2003. Age-dependent modulation of hippocampal excitability by KCNQ-channels. *Epilepsy Res* 53:81-94.
- Pan Z, Kao T, Horvath Z, Lemos J, Sul JY, Cranstoun SD, Bennett V, Scherer SS, Cooper EC. 2006. A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J Neurosci* 26:2599-2613.
- Panaghie G, Tai KK, Abbott GW. 2006. Interaction of KCNE subunits with the KCNQ1 K⁺ channel pore. *J Physiol* 570:455-467.
- Papazian DM. 1999. Potassium channels: some assembly required. *Neuron* 23:7-10.
- Park KH, Piron J, Dahimene S, Merot J, Baro I, Escande D, Loussouarn G. 2005. Impaired KCNQ1-KCNE1 and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate interaction underlies the long QT syndrome. *Circ Res* 96:730-739.
- Parry DA, Fraser RD, Squire JM. 2008. Fifty years of coiled-coils and alpha-helical bundles: a close relationship between sequence and structure. *J Struct Biol* 163:258-269.
- Perozo E, Cortes DM, Cuello LG. 1999. Structural rearrangements underlying K⁺-channel activation gating. *Science* 285:73-78.
- Pfaffinger PJ, DeRubeis D. 1995. Shaker K⁺ channel T1 domain self-tetramerizes to a stable structure. *J Biol Chem* 270:28595-28600.
- Portwich M, Keller S, Strauss HM, Mahrenholz CC, Kretzschmar I, Kramer A, Volkmer R. 2007. A network of coiled-coil associations derived from synthetic GCN4 leucine-zipper arrays. *Angew Chem Int Ed Engl* 46:1654-1657.
- Provencher SW, Glockner J. 1981. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20:33-37.
- Rehm H. 2002. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Rose A, Meier I. 2004. Scaffolds, levers, rods and springs: diverse cellular functions of long coiled-coil proteins. *Cell Mol Life Sci* 61:1996-2009.
- Rost B, Yachdav G, Liu J. 2004. The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res* 32:W321-326.

- Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HH, Jr., Erlich HA. 1988. Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* 319:537-541.
- Sambrook J, Russell DW. 2000. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour: Harbor Laboratory Press.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT. 1996. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 384:80-83.
- Schenzer A, Friedrich T, Pusch M, Saftig P, Jentsch TJ, Grotzinger J, Schwake M. 2005. Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K⁺ channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine. *J Neurosci* 25:5051-5060.
- Schmitt N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B, Pongs O. 2000. A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *Embo J* 19:332-340.
- Schroeder BC, Waldegger S, Fehr S, Bleich M, Warth R, Greger R, Jentsch TJ. 2000 a. A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* 403:196-199.
- Schroeder BC, Hechenberger M, Weinreich F, Kubisch C, Jentsch TJ. 2000 b. KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J Biol Chem* 275:24089-24095.
- Schroeder BC, Kubisch C, Stein V, Jentsch TJ. 1998. Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature* 396:687-690.
- Schwake M, Athanasiadu D, Beimgraben C, Blanz J, Beck C, Jentsch TJ, Saftig P, Friedrich T. 2006. Structural determinants of M-type KCNQ (Kv7) K⁺ channel assembly. *J Neurosci* 26:3757-3766.
- Schwake M, Jentsch TJ, Friedrich T. 2003. A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K(+) channel assembly. *EMBO Rep* 4:76-81.
- Schwake M, Pusch M, Kharkovets T, Jentsch TJ. 2000. Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K⁺ channels involved in epilepsy. *J Biol Chem* 275:13343-13348.
- Schwarz JR, Glassmeier G, Cooper EC, Kao TC, Nodera H, Tabuena D, Kaji R, Bostock H. 2006. KCNQ channels mediate IKs, a slow K⁺ current regulating excitability in the rat node of Ranvier. *J Physiol* 573:17-34.
- Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML, Gagnon D, Rosales TO, Peiffer A, Anderson VE, Leppert M. 1998. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 18:25-29.
- Singh SM, Panda AK. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* 99:303-310.
- Smith JS, Iannotti CA, Dargis P, Christian EP, Aiyar J. 2001. Differential expression of *kcq2* splice variants: implications to m current function during neuronal development. *J Neurosci* 21:1096-1103.
- Sorkina T, Miranda M, Dionne KR, Hoover BR, Zahniser NR, Sorkin A. 2006. RNA interference screen reveals an essential role of Nedd4-2 in dopamine transporter ubiquitination and endocytosis. *J Neurosci* 26:8195-8205.
- Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Atkinson DL, Keating MT. 1997. Molecular basis of the long-QT syndrome associated with deafness. *N Engl J Med* 336:1562-1567.

- Stagljar I, Korostensky C, Johnsson N, te Heesen S. 1998. A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5187-5192.
- Staub O, Gautschi I, Ishikawa T, Breitschopf K, Ciechanover A, Schild L, Rotin D. 1997. Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. *Embo J* 16:6325-6336.
- Stogios PJ, Downs GS, Jauhal JJ, Nandra SK, Prive GG. 2005. Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol* 6:R82.
- Strutz-Seebohm N, Seebohm G, Fedorenko O, Baltaev R, Engel J, Knirsch M, Lang F. 2006. Functional coassembly of KCNQ4 with KCNE-beta- subunits in *Xenopus* oocytes. *Cell Physiol Biochem* 18:57-66.
- Stryer L. 1999. *Biochemie*. Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Sudol M. 1996. Structure and function of the WW domain. *Prog Biophys Mol Biol* 65:113-132.
- Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S. 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328:313-318.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 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* 22:4673-4680.
- Tinel N, Diochot S, Borsotto M, Lazdunski M, Barhanin J. 2000 a. KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *Embo J* 19:6326-6330.
- Tinel N, Diochot S, Lauritzen I, Barhanin J, Lazdunski M, Borsotto M. 2000 b. M-type KCNQ2-KCNQ3 potassium channels are modulated by the KCNE2 subunit. *FEBS Lett* 480:137-141.
- Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY. 2006. How does voltage open an ion channel? *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:23-52.
- Tu L, Deutsch C. 1999. Evidence for dimerization of dimers in K⁺ channel assembly. *Biophys J* 76:2004-2017.
- Tu L, Santarelli V, Deutsch C. 1995. Truncated K⁺ channel DNA sequences specifically suppress lymphocyte K⁺ channel gene expression. *Biophys J* 68:147-156.
- Tzingounis AV, Nicoll RA. 2008. Contribution of KCNQ2 and KCNQ3 to the medium and slow afterhyperpolarization currents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19974-19979.
- Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T, Hara K, Horikoshi M, Andersen G, Ng DP, Holmkvist J, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Sandbaek A, Lauritzen T, Hansen T, Nurbaya S, Tsunoda T, Kubo M, Babazono T, Hirose H, Hayashi M, Iwamoto Y, Kashiwagi A, Kaku K, Kawamori R, Tai ES, Pedersen O, Kamatani N, Kadowaki T, Kikkawa R, Nakamura Y, Maeda S. 2008. SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. *Nat Genet*.
- VanDongen AM, Frech GC, Drewe JA, Joho RH, Brown AM. 1990. Alteration and restoration of K⁺ channel function by deletions at the N- and C-termini. *Neuron* 5:433-443.
- Ventura S, Villaverde A. 2006. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol* 24:179-185.
- Vriend G. 1990. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph* 8:52-56, 29.
- Wang H, Iguchi N, Rong Q, Zhou M, Ogunkorode M, Inoue M, Pribitkin EA, Bachmanov AA, Margolskee RF, Pfeifer K, Huang L. 2009. Expression of the voltage-gated potassium channel KCNQ1 in mammalian taste bud cells and the effect of its null-mutation on taste preferences. *J Comp Neurol* 512:384-398.

- Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, McKinnon D. 1998 a. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282:1890-1893.
- Wang W, Xia J, Kass RS. 1998 b. MinK-KvLQT1 fusion proteins, evidence for multiple stoichiometries of the assembled IsK channel. *J Biol Chem* 273:34069-34074.
- Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT. 1996. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 12:17-23.
- Watanabe H, Nagata E, Kosakai A, Nakamura M, Yokoyama M, Tanaka K, Sasai H. 2000. Disruption of the epilepsy KCNQ2 gene results in neural hyperexcitability. *J Neurochem* 75:28-33.
- Wiener R, Haitin Y, Shamgar L, Fernandez-Alonso MC, Martos A, Chomsky-Hecht O, Rivas G, Attali B, Hirsch JA. 2008. The KCNQ1 (Kv7.1) COOH terminus, a multitiered scaffold for subunit assembly and protein interaction. *J Biol Chem* 283:5815-5830.
- Yang WP, Levesque PC, Little WA, Conder ML, Ramakrishnan P, Neubauer MG, Blar MA. 1998. Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy. *J Biol Chem* 273:19419-19423.
- Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Mori H, Jonsson A, Sato Y, Yamagata K, Hinokio Y, Wang HY, Tanahashi T, Nakamura N, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Takeda J, Maeda E, Shin HD, Cho YM, Park KS, Lee HK, Ng MC, Ma RC, So WY, Chan JC, Lyssenko V, Tuomi T, Nilsson P, Groop L, Kamatani N, Sekine A, Nakamura Y, Yamamoto K, Yoshida T, Tokunaga K, Itakura M, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. 2008. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet*.
- Yeung SY, Lange W, Schwake M, Greenwood IA. 2008. Expression profile and characterisation of a truncated KCNQ5 splice variant. *Biochem Biophys Res Commun* 371:741-746.
- Yu YB. 2002. Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential. *Adv Drug Deliv Rev* 54:1113-1129.
- Yus-Najera E, Santana-Castro I, Villarroel A. 2002. The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels. *J Biol Chem* 277:28545-28553.
- Zerangue N, Jan YN, Jan LY. 2000. An artificial tetramerization domain restores efficient assembly of functional Shaker channels lacking T1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3591-3595.
- Zhang H, Craciun LC, Mirshahi T, Rohacs T, Lopes CM, Jin T, Logothetis DE. 2003. PIP(2) activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* 37:963-975.
- Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A, MacKinnon R. 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414:43-48.

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt,

- dass ich diese Abhandlung selbständig und nur unter Verwendung der hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel unter Beratung durch meine akademischen Betreuer erstellt habe,
- dass diese Abhandlung noch nicht an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde,
- dass Teilergebnisse der vorliegenden Abhandlung zur Veröffentlichung eingereicht wurden,
- dass es keine Promotionsversuche in der gleichen Fakultät oder vergleichbaren Fachbereichen gab,
- dass ich für die mündliche Prüfung die Form der Disputation wähle.

Kiel, den 1. April 2009

Christina Wehling

10 Lebenslauf

Name: Christina Wehling
Anschrift: Waitzstraße 97, 24118 Kiel
Geburtsdatum: 09.02.1980
Geburtsort: Preetz (Holstein)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Werdegang:

1986-1990	Grundschule Schellhorn
1990-1999	Friedrich-Schiller-Gymnasium, Preetz Abschluss mit Abitur
10/1999	Beginn des Biochemie- und Molekularbiologie-Studiums an der Christians-Albrechts-Universität zu Kiel
10/2001	Erlangung des Vordiploms der Biochemie- und Molekularbiologie
10/2003	Diplomprüfungen im Hauptfach (Biochemie) und den drei Nebenfächern (Pharmazeutische Chemie, Mikrobiologie und Physikalische Chemie)
10/2004	Fertigstellung der Diplomarbeit zum Thema „in organello Prozessierung mitochondrialer Transkripte Höherer Pflanzen“ und Erlangung des Diploms
seit 12/2004	Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Professor Saftig am Biochemischen Institut der Universität Kiel
10/2005 bis 09/2008	Promotionsstipendiatin der „Friedrich-Naumann-Stiftung für die Freiheit“
seit 10/2008	Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Professor Saftig

Veröffentlichungen: **C. Wehling**, C. Beimgraben, C. Gelhaus, T. Friedrich,
P. Saftig, J. Grotzinger und M. Schwake (2007).
"Self-assembly of the isolated *KCNQ2* subunit
interaction domain." FEBS Lett 581: 1594-1598.

Kiel, den 01. April 2009

11 Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gebührt all denjenigen, die mir das Anfertigen dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

- Ich bedanke mich bei Professor Dr. Paul Saftig für die Möglichkeit zur Promotion, dass er sich stets Zeit für Fragen und Diskussionen nahm, sein offenes Ohr für sämtliche Probleme, sowie die fortwährende Unterstützung meiner Arbeit.
- Ich bedanke mich bei PD Dr. Michael Schwake für seine umfassende Betreuung, Geduld und das überaus ergiebige Thema.
- Ich bedanke mich bei der Friedrich-Naumann-Stiftung für ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten und die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.
- Ich bedanke mich bei Professor Dr. Joachim Grötzinger für die Möglichkeit zur Durchführung zahlreicher Experimente und die wertvollen Diskussionen.
- Ich bedanke mich bei Dr. Thomas Höfken, Professor Dr. Markus Bleich, Dr. Christoph Gelhaus, Dr. Jeroen Mesters und Dr. Alexey Rak für ihre Hilfe bei der Durchführung verschiedener Experimente.
- Ich bedanke mich bei allen Kollegen und Mitarbeitern des Biochemischen Instituts, insbesondere bei denen, die in mir nicht nur einen Mitarbeiter, sondern auch einen Menschen gesehen haben.
- Ich bedanke mich bei meinen Freunden, die mich seit vielen Jahren begleiten, und bei meiner Familie. Insbesondere freut es mich, dass meine Mutter diese Arbeit in ihren Händen halten kann. Ganz besonders danken möchte ich Markus für seine Nähe und Wärme und dass er mir stets den Rücken freihält.

Vielen Dank!